



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類7 C12Q 1/34, G01N 33/49</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/32808</p> <p>(43) 国際公開日 2000年6月8日(08.06.00)</p>		
<table border="1"> <tr> <td data-bbox="99 384 803 1087"> <p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/06745</p> <p>(22) 国際出願日 1999年12月1日(01.12.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/342759 1998年12月2日(02.12.98)</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 アズウェル(AZWELL INC.)[JP/JP] 〒567-8575 大阪府大阪市中央区石町2丁目2番9号 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 山口誠博(YAMAGUCHI, Masahiro)[JP/JP] 〒567-0065 大阪府茨木市上郡2丁目8番20号 Osaka, (JP) 小坂哲也(KOSAKA, Tetsuya)[JP/JP] 〒567-0023 大阪府茨木市西河原1丁目18番613号 Osaka, (JP) 豊里満良(TOYOSATO, Mitsuyoshi)[JP/JP] 〒606-0065 京都府京都市左京区上高野八幡町6番地 Kyoto, (JP) 水野耕治(MIZUNO, Kouji)[JP/JP] 〒610-1146 京都府京都市西京区大原野西境谷町 2丁目1番地4-201 Kyoto, (JP)</p> </td> <td data-bbox="803 384 1518 1087"> <p>宗田靖二(SODA, Yasuji)[JP/JP] 〒658-0003 兵庫県神戸市東灘区本山北町4丁目5番11号 Hyogo, (JP) 岩倉文月(Iwakura, Fuzuki)[JP/JP] 〒533-0013大阪府大阪市東淀川区豊里2丁目13-7-406 Osaka, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 南條博道(NANJO, Hiromichi) 〒530-0047 大阪府大阪市北区西天満3丁目2番4号 大三ビル3階 Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p> </td> </tr> </table>			<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/06745</p> <p>(22) 国際出願日 1999年12月1日(01.12.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/342759 1998年12月2日(02.12.98)</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 アズウェル(AZWELL INC.)[JP/JP] 〒567-8575 大阪府大阪市中央区石町2丁目2番9号 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 山口誠博(YAMAGUCHI, Masahiro)[JP/JP] 〒567-0065 大阪府茨木市上郡2丁目8番20号 Osaka, (JP) 小坂哲也(KOSAKA, Tetsuya)[JP/JP] 〒567-0023 大阪府茨木市西河原1丁目18番613号 Osaka, (JP) 豊里満良(TOYOSATO, Mitsuyoshi)[JP/JP] 〒606-0065 京都府京都市左京区上高野八幡町6番地 Kyoto, (JP) 水野耕治(MIZUNO, Kouji)[JP/JP] 〒610-1146 京都府京都市西京区大原野西境谷町 2丁目1番地4-201 Kyoto, (JP)</p>	<p>宗田靖二(SODA, Yasuji)[JP/JP] 〒658-0003 兵庫県神戸市東灘区本山北町4丁目5番11号 Hyogo, (JP) 岩倉文月(Iwakura, Fuzuki)[JP/JP] 〒533-0013大阪府大阪市東淀川区豊里2丁目13-7-406 Osaka, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 南條博道(NANJO, Hiromichi) 〒530-0047 大阪府大阪市北区西天満3丁目2番4号 大三ビル3階 Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/06745</p> <p>(22) 国際出願日 1999年12月1日(01.12.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/342759 1998年12月2日(02.12.98)</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 アズウェル(AZWELL INC.)[JP/JP] 〒567-8575 大阪府大阪市中央区石町2丁目2番9号 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 山口誠博(YAMAGUCHI, Masahiro)[JP/JP] 〒567-0065 大阪府茨木市上郡2丁目8番20号 Osaka, (JP) 小坂哲也(KOSAKA, Tetsuya)[JP/JP] 〒567-0023 大阪府茨木市西河原1丁目18番613号 Osaka, (JP) 豊里満良(TOYOSATO, Mitsuyoshi)[JP/JP] 〒606-0065 京都府京都市左京区上高野八幡町6番地 Kyoto, (JP) 水野耕治(MIZUNO, Kouji)[JP/JP] 〒610-1146 京都府京都市西京区大原野西境谷町 2丁目1番地4-201 Kyoto, (JP)</p>	<p>宗田靖二(SODA, Yasuji)[JP/JP] 〒658-0003 兵庫県神戸市東灘区本山北町4丁目5番11号 Hyogo, (JP) 岩倉文月(Iwakura, Fuzuki)[JP/JP] 〒533-0013大阪府大阪市東淀川区豊里2丁目13-7-406 Osaka, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 南條博道(NANJO, Hiromichi) 〒530-0047 大阪府大阪市北区西天満3丁目2番4号 大三ビル3階 Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>			
<p>(54)Title: METHOD FOR ASSAYING PLATELET-ACTIVATING-FACTOR ACETYLHYDROLASE ACTIVITY</p> <p>(54)発明の名称 血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ活性の測定方法</p> <p>(57) Abstract Platelet-activating-factor acetylhydrolase activity can be directly assayed safely, quickly, conveniently and accurately at a high sensitivity by using a PAF-analogous compound containing a chromophore substituent in its structure as a substrate and, further, using an inhibitor for an esterase activity-related substance other than platelet-activating-factor acetylhydrolase.</p>				

(57)要約

発色性置換基を構造中に含む P A F 類似体化合物を基質とし、さらに、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ以外のエステル分解活性関連物質の阻害剤を共存させることにより、安全、迅速、簡便、正確、かつ高精度に、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ活性を直接測定することができる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサオ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NL	オランダ	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NO	ノールウェー	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	JP	日本	NZ	ニュージーランド	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KE	ケニア	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェッコ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DK	デンマーク	KR	韓国				

## 明 細 書

## 血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ活性の測定方法

## 5 技術分野

本発明は、臨床的に重要な血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ活性を測定する方法、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ活性測定用試薬、その試薬を利用する血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ活性測定用キットに関する。

10

## 背景技術

15

血小板活性化因子 (platelet activating Factor: 1-アルキル-2-アセチル-sn-グリセロール-3-ホスホコリン、以下、PAFと省略する) は、炎症やアレルギー反応等広範囲の各種病態発症に関するメディエーターである。一方、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ (以下、PAF-AHという) は、PAFの持つ強力な生物活性を消去する機能を有しており、生体内PAFレベルを調節し、生体の恒常性維持に関与している。そして、川崎病、全身性エリトマトーデス、溶血性尿毒症症候群等の疾患において、これらの病態の進行に伴い、健康時には認められない血清中のPAF-AH活性の変動が観察されている。

20

このように、血清または血漿中のPAF-AH活性は各種炎症性患者の発症、病態変化を反映しているので、PAF-AH活性の測定は、これらの疾患の診断に有用な情報をもたらす新規な臨床検査法として重要なものである。さらに、血清PAF-AH欠損者が存在し、この酵素欠損が重篤な小児喘息のリスクファクターとみなされており、PAF-AH活性の測定は予防医学の面からも重要であることが示唆されている。

25

従来、P A F - A H活性の測定には、バイオアッセイによる方法と放射性同位元素を用いる方法とが用いられてきた。

バイオアッセイ法は、P A F - A Hと基質のP A Fとを一定時間反応させ、残存するP A Fによる血小板凝集能をモニターすることにより、P A F - A Hを測定する方法であるが、血小板を使用時に調製しなければならない、高価な試薬を用いなければならない等の欠点があり、一般の検査法として利用するには困難な問題点が存在した。

他方、放射性同位元素を用いる方法（R I A法）は、 $^3\text{H}$ 又は $^{14}\text{C}$ でP A Fのアセチル基を標識してP A F - A Hと反応させ、遊離された放射能活性を測定するか、又はアルキル基を標識してP A F - A Hと反応させ、反応生成物であるリゾP A F又は未反応のP A Fを回収して放射能活性を測定する方法である。しかし、この放射性同位元素を用いる方法では、放射性物質の使用及び使用設備が限定される上、安全性の問題、放射性試薬の廃棄等の問題がある。さらに、標識されたリゾP A Fあるいは未反応の標識されたP A Fを回収して残存する放射能活性を測定する場合には、リゾP A FあるいはP A Fを有機溶剤で抽出し、クロマトグラフィーで分離しなければならない等の煩雑な操作が必要とされる等、一般の検査法として利用するには困難な問題点が存在した。

そこで、このような煩雑な操作を要することなく、P A F - A H活性を測定する方法が検討されている。その一つの方法は、合成基質を用いる方法であり、近年、種々のP A F - A Hの基質並びにP A F - A Hの測定法が開発されている。

例えば、特開平7-59597号公報には、P A F - A Hの作用によりジカルボン酸を遊離するP A F類似化合物を基質として、P A F - A H活性を測定する方法が記載されている。この方法は、この基質に試料中のP A F - A Hを作用させてジカルボン酸を生成させ、ついで生成したジカルボン酸に

特異的に反応する酵素を作用させ、さらに連続する酵素反応系を組み合わせ  
て、 $\text{NAD}^+$ 、 $\text{NADP}^+$ 、 $\text{NADH}$ 、 $\text{NADPH}$ 又は過酸化水素等の汎用さ  
れているマーカー物質を生成させ、これらのマーカー物質を公知の方法によ  
り測定することにより、ジカルボン酸の生成速度又は生成量を求め、これに  
5 より  $\text{PAF-AH}$  活性を測定する方法である。この方法は、検出系に多数の  
酵素を組み合わせた酵素的測定法であるため、使用する酵素の安定性や特異  
性等の問題があり、試薬の性能を維持するのに注意を払う必要がある等の問  
題点がある。

また、特開平 4-346797 号公報には、チオ  $\text{PAF}$  およびチオ  $\text{PAF}$   
10 類似体化合物を基質とする  $\text{PAF-AH}$  活性測定法が記載されている。この  
方法は、 $\text{SH}$  基と反応して定量的に呈色する呈色試薬を利用する方法である。  
この公報には、 $\text{PAF-AH}$  によりチオ  $\text{PAF}$  等の基質から生成するリゾチ  
オ  $\text{PAF}$  の  $-\text{SH}$  基と 5, 5'-ジチオビス (2-ニトロ安息香酸) との置  
換反応によって遊離する 2-ニトロ-5-メルカプト安息香酸の黄色を追跡  
15 する方法が一例として記載されているが、この方法は、反応液や検体中に共  
存する他のチオール化合物や酸化還元性物質、例えばアスコルビン酸、ビリ  
ルビン、システイン又はグルタチオン等の干渉を受けやすく、酵素的測定法  
と同様に試薬の性能維持の面で問題がある。

また、特公平 4-66864 号公報 (対応特許：米国特許第 5, 091,  
20 527 号) には、ホスホリパーゼの基質として  $\text{PAF}$  類似化合物が記載され  
ている。しかし、この公報には、実際にこの  $\text{PAF}$  類似化合物が  $\text{PAF-AH}$   
 $\text{H}$  の基質となり得るという実験データが示されていない。他方で、この  $\text{PAF}$   
 $\text{F}$  類似化合物である 1-デカノイル-2-(4-ニトロフェニルグルタリ  
ル)-sn-グリセロールホスホコリンを基質とする  $\text{PAF-AH}$  活性測定法  
25 が知られている (Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 1  
6 巻, No 4 591-599 (1996))。しかしながら、この測定法では、血漿ある

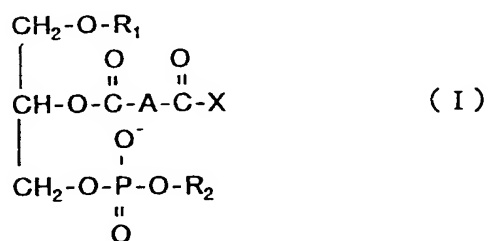
いは血清等の検体中に存在する種々のエステラーゼあるいはエステラーゼ様物質によっても基質が加水分解されることから、測定値は大きな正の影響を受け、正確な PAF-AH 活性の測定は困難であった。

そこで、種々のエステラーゼやエステラーゼ様物質の影響を受けることのない PAF-AH 活性の測定方法であって、放射性基質を用いることなく、安全でかつ操作が簡便な直接測定方法が望まれていた。すなわち、PAF-AH に特異性の高い基質、あるいは、種々のエステラーゼやエステラーゼ様物質の影響を受けることが少ない測定系の開発が望まれている。

#### 10 発明の開示

本発明者らは、上記課題を解決すべく、鋭意研究を行った結果、PAF-AH に比較的特異性が高い基質及び種々のエステラーゼやエステラーゼ様物質の影響を受けることのない PAF-AH 測定系を見出し、放射性基質を用いない、安全でかつ操作が簡便な、直接 PAF-AH 活性を測定できる方法を開発し、本発明を完成するに至った。

本発明は、PAF-AH 活性の測定方法であって、一般式 (I) :



(式中、R<sub>1</sub> はアシル基、アルキル基又はアルケニル基を表し、A は酸素原子が介在してもよい飽和または不飽和の、置換又は非置換の炭素数 2～7 の炭化水素基を表し、X は遊離したときに発色性化合物又は蛍光発色性化合物となる基を表し、R<sub>2</sub> はモノメチルアミノエチル基、ジメチルアミノエチ

ル基又はトリメチルアミノエチル基を表す。) で表される基質と、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ含有試料とを、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼを阻害しないが、他のエステル分解活性関連物質を阻害する阻害剤の存在下、反応させ、それによって遊離する発色性化合物又は蛍光発色性化合物の量を測定することを含む方法に関する。

好適な実施態様においては、前記発色性化合物が芳香族ヒドロキシ化合物又は芳香族チオール化合物である。

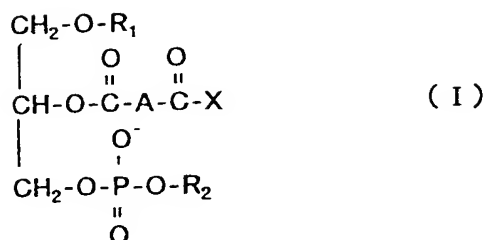
好適な実施態様においては、本発明の測定方法に用いられる阻害剤が、アニオン性界面活性剤、非イオン界面活性剤、胆汁酸塩、胆汁酸塩誘導体及びキレート剤からなる群から選択される少なくとも1種の阻害剤である。

また、好適な実施態様においては、本発明の測定方法に用いられるアニオン性界面活性剤が、アルキル硫酸のアルカリ金属塩又はアルキルスルホン酸のアルカリ金属塩である。

また、好適な実施態様においては、本発明の測定方法に用いられる非イオン界面活性剤が、ポリオキシエチレンアルキルアリルエーテル又はポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルである。

また、好適な実施態様においては、本発明の測定方法に用いられる胆汁酸塩及び胆汁酸塩誘導体が、コール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム、ケノデオキシコール酸ナトリウム、デヒドロコール酸ナトリウム、タウロコール酸ナトリウム、タウロリトコール酸ナトリウム、タウロデオキシコール酸ナトリウム、タウロケノデオキシコール酸ナトリウム、タウロウルソデオキシコール酸ナトリウム、タウロデヒドロコール酸ナトリウム、CHAPS、CHAPSO、BIGCHAP、又はデオキシ-BIGCHAPである。

また、本発明は、PAF-AH活性測定用試薬に関し、一般式(I)：



(式中、 $R_1$ はアシル基、アルキル基又はアルケニル基を表し、Aは酸素原子が介在してもよい飽和または不飽和の、置換又は非置換の炭素数2～7の炭化水素基を表し、Xは遊離したときに発色性化合物又は蛍光発色性化合物となる基を表し、 $R_2$ はモノメチルアミノエチル基、ジメチルアミノエチル基又はトリメチルアミノエチル基を表す。)で表される基質と、PAF-AHを阻害しないが、他のエステル分解活性関連物質を阻害する阻害剤とを含有する、試薬に関する。

好適な実施態様においては、PAF-AHとの反応に伴って、基質から芳香族ヒドロキシ化合物又は芳香族チオール化合物が遊離される。

好適な実施態様においては、本発明の試薬に含まれる阻害剤が、アニオン性界面活性剤、非イオン界面活性剤、胆汁酸塩、胆汁酸塩誘導体及びキレート剤からなる群から選択される少なくとも1種の阻害剤である。

また、好適な実施態様においては、本発明の試薬に含まれるアニオン性界面活性剤が、アルキル硫酸のアルカリ金属塩又はアルキルスルホン酸のアルカリ金属塩である。

また、好適な実施態様においては、本発明の試薬に含まれる非イオン界面活性剤が、ポリオキシエチレンアルキルアリルエーテル又はポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルである。

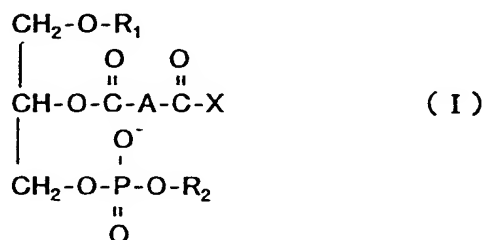
また、好適な実施態様においては、本発明の試薬に含まれる胆汁酸塩及び胆汁酸塩誘導体が、コール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム、ケノデオキシコール酸ナトリウム、デヒドロコール酸ナトリウム、タウロコー



ル酸ナトリウム、タウロリトコール酸ナトリウム、タウロデオキシコール酸  
 ナトリウム、タウロケノデオキシコール酸ナトリウム、タウロウルソデオキ  
 シコール酸ナトリウム、タウロデヒドロコール酸ナトリウム、CHAPS：  
 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio] propanesulfonic acid、CH  
 5 APSO：3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio] -2-hydroxypro  
 panesulfonic acid、BIGCHAP：N,N-Bis(3-D-gluconamidopropy  
 l)cholamide、又はデオキシ-BIGCHAP：N,N-Bis(3-D-gluconamid  
 opropyl)deoxycholamideである。

本発明は、さらに、前記試薬を含む、血小板活性化因子アセチルヒドロラ  
 10 ーゼ活性測定用キットに関する。

また、本発明は、PAF-AH活性測定用キットであって、上記一般式  
 (I)



(式中、R<sub>1</sub>はアシル基、アルキル基又はアルケニル基を表し、Aは酸素原  
 子が介在してもよい飽和または不飽和の、置換又は非置換の炭素数2～7の  
 20 炭化水素基を表し、Xは遊離したときに発色性化合物又は蛍光発色性化合物  
 となる基を表し、R<sub>2</sub>はモノメチルアミノエチル基、ジメチルアミノエチル  
 基又はトリメチルアミノエチル基を表す。)で表される基質を含む容器と、

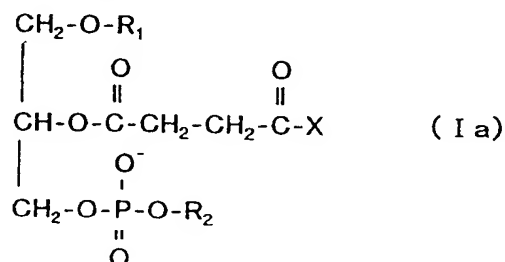
PAF-AHを阻害しないが、他のエステル分解活性関連物質を阻害する  
 阻害剤を含有する溶液を含む容器とを有する、キットに関する。

好適な実施態様においては、PAF-AHとの反応に伴って、基質から芳  
 25 香族ヒドロキシ化合物又は芳香族チオール化合物が遊離される。

好適な実施態様においては、前記基質が、溶液あるいは溶媒中に溶解されている。

別の好適な実施態様においては、本発明のキットは、さらに、前記基質を溶解する溶液あるいは溶媒を含有する容器を有する。

5 さらに、本発明は、一般式 (I a) で表される化合物：



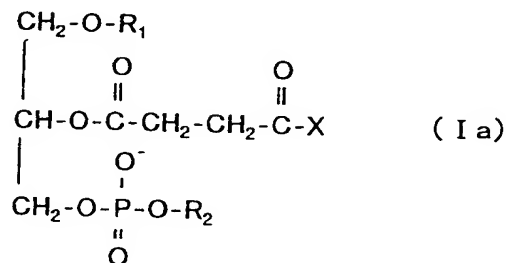
10

(式中、 $\text{R}_1$ は炭素数6から20のアシル基、アルキル基又はアルケニル基を表し、Xは遊離したときに発色性化合物又は蛍光発色性化合物となる基を表し、 $\text{R}_2$ はモノメチルアミノエチル基、ジメチルアミノエチル基又はトリメチルアミノエチル基を表す。) に関する。

15 好適な実施態様においては、前記発色性化合物が芳香族ヒドロキシ化合物又は芳香族チオール化合物である。

また、本発明は、PAF-AH活性の測定方法に関し、一般式 (I a) で表される化合物：

20



25 (式中、 $\text{R}_1$ は炭素数6から20のアシル基、アルキル基又はアルケニル基を表し、Xは遊離したときに発色性化合物又は蛍光発色性化合物となる基を表し、 $\text{R}_2$ はモノメチルアミノエチル基、ジメチルアミノエチル基又はト

リメチルアミノエチル基を表す。) で表される基質と、P A F - A H 含有試料とを反応させ、それによって遊離する発色性化合物又は蛍光発色性化合物の量を測定することを含む測定方法に関する。

好適な実施態様においては、前記発色性化合物が芳香族ヒドロキシ化合物又は芳香族チオール化合物である。

上記の発明により、P A F - A H に比較的特異性が高い基質、及び種々のエステラーゼやエステラーゼ様物質の影響を受けることのない P A F - A H の直接測定系が提供される。さらに、本発明は放射性基質を用いないので、日常の検査に安全、迅速、簡単な測定方法として充分利用できる方法を提供する。このように本発明の P A F - A H の測定方法は、(1) 従来の方法より測定時間が短縮される、(2) 種々のエステラーゼやエステラーゼ様物質の影響を受けない、(3) 発色性化合物または蛍光発色性化合物をモニターすることにより直接 P A F - A H 活性を測定できる等の利点を有することから、従来法である発色系へ誘導する酵素や試薬を使用する方法よりも正確な測定が可能である。従って、本発明は、疾患の検定、予後の経過を短時間で診断できるため極めて有用性が高い発明である。

さらに、本発明により、P A F - A H 測定用の試薬並びにこれを含むキットが提供される。これらの試薬、キットにより、直接かつ簡便に P A F - A H 活性が測定できるので、P A F - A H 活性の変化に基づく疾患の診断、病状の進行が把握できる。従って、本発明の医療における貢献は大きい。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は阻害剤がない場合の試料中の P A F - A H 活性を測定した時のタイムコースを示した図である。

図 2 は阻害剤がある場合の試料中の P A F - A H 活性を測定した時の吸光度の変化を示した図である。

図3は阻害剤を用いない測定方法と放射性標識基質を用いる測定方法との相関を示した図である。

図4は阻害剤を用いる場合の測定方法（本発明の測定方法）と放射性標識基質を用いる測定方法との相関を示した図である。

5

発明を実施するための最良の形態

（本発明の測定方法の特徴）

本発明の、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ（PAF-AH）活性の測定方法の特徴は、上記一般式（I）で表される基質と共に、PAF-AH以外のエステル分解活性関連物質を阻害する阻害剤を添加することにより、  
10 これらのエステル分解活性関連物質による非特異的加水分解による発色性化合物あるいは蛍光発色性の化合物の放出を防止して、より精度よく、PAF-AH活性を測定する点にある。すなわち、基質から遊離される発色性あるいは蛍光発色性の化合物が、できるだけPAF-AHにのみ由来する様に測定系を設計することにある。また、一般式（I）の基質のうち、一般式（I  
15 a）で表される基質を用いれば、さらに感度よく測定することができる。

本発明に用いる基質は、PAF-AHと反応すると、発色性あるいは蛍光発色性の化合物と結合したジカルボン酸誘導体を遊離するが、このジカルボン酸誘導体は遊離されると、発色性あるいは蛍光発色性の化合物を遊離（放  
20 出）するという特徴を有している。すなわち、本発明に用いる基質とPAF-AHとが反応したとき、PAF-AH活性と比例する量の発色性あるいは蛍光発色性置換芳香族化合物を遊離するため、その遊離された発色性あるいは蛍光発色性の化合物をモニターすることで、直接的にPAF-AH活性を測定することができる。

25

従来の測定法は、基質とPAF-AHを接触させて生成するジカルボン酸を酵素的に発色系に導くか、あるいは、5, 5'-ジチオビス（2-ニトロ

安息香酸)との置換を通して、遊離する2-ニトロ-5-メルカプト安息香酸の発色系に導いており、直接的な発色ではないため、基質自体の分解だけでなく酵素の失活や他の発色系へ導く組成物の劣化等、測定の不正確性に関与する要素が多く、正確にPAF-AH活性値を得られないことがあった。

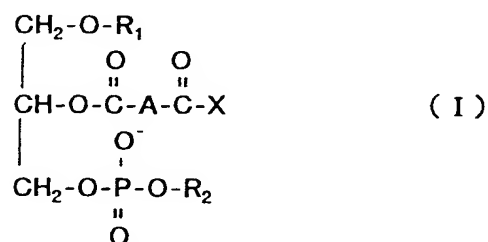
- 5      本発明の測定法によって、これら問題点が解決されるという格別な効果が奏される。すなわち、本発明による測定方法においては、PAF-AHによって直接的に検出可能な発色性あるいは蛍光発色性の化合物を生成するので、血清試料、血漿試料等に含まれるエステル分解活性関連物質による測定誤差をできるだけ小さくして、精度良くPAF-AH活性を測定することができる。
- 10      る。

- 本願明細書において「エステル分解活性関連物質」には、エステル分解酵素(エステラーゼ)、エステル分解酵素(エステラーゼ)様物質などの、エステル結合を切断する酵素あるいは物質が含まれる。エステル分解酵素(エステラーゼ)様物質としては、例えば、LDLに含まれるアポリポタンパク
- 15      B等のエステラーゼ活性を有するタンパク質が挙げられる。

    以下、本発明に用いる基質、その製造方法、本発明に用いる阻害剤、PAF-AHの測定用試薬、その試薬を用いる測定方法、及びPAF-AHの測定用キットについて、順次説明する。

    (本発明に用いる基質)

- 20      本発明のPAF-AH測定方法に用いる基質は、一般式(I)で表される。
- 一般式(I)：



において、 $R_1$ はアシル基、アルキル基又はアルケニル基が好ましい。炭素数は約6から約20位が好ましい。より好ましくは、約10から約16であり、さらに好ましくは、約12～14である。

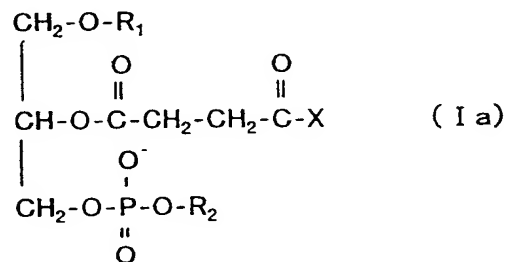
Aとしては、飽和または不飽和の、置換又は非置換の炭素数2～7の炭化水素基が好ましい。なかでも、炭素数2の化合物が好ましい。また、この炭化水素基は、酸素原子が介在してもよい。すなわち、 $-C-O-C-$ 等の構造を有してもよい。

Xは、 $PAF-AH$ と基質とが反応して、ジカルボン酸誘導体が遊離すると遊離（放出）される化合物であり、発色性あるいは蛍光発色性であることが好ましい。Xは、好ましくは、加水分解されたときに、芳香族ヒドロキシ化合物又は芳香族チオール化合物となる基であり、例えば、4-ニトロフェニル基、2-クロロ-4-ニトロフェニル基、2-フルオロ-4-ニトロフェニル基、3-フルオロ-4-ニトロフェニル基、4-ニトロチオフェニル基、5-インドリルオキシ基、2,6-ジフェニル-4-ニトロフェニル基が挙げられる。

蛍光発色性化合物としては、4-メチルクマリル基、クマリル基、フラボンオキシル基等が挙げられる。

$R_2$ としては、モノメチルアミノエチル基、ジメチルアミノエチル基又はトリメチルアミノエチル基が挙げられる。トリメチルアミノ基が好ましい。

基質の中でも、Aの炭素数が2である基質は、一般式(Ia)で表わされる。



一般式 (I a) 中、 $R_1$ 、X、及び $R_2$ は、それぞれ、前記 $R_1$ 、X、及び $R_2$ と同じである。一般式 (I a) である化合物としては、例えば、1-ミリスチル-2-(4-ニトロフェニルサクシニル)-sn-グリセロールホスホコリン (化合物8)、1-パルミトイル-2-(4-ニトロフェニルサクシニル)-sn-グリセロールホスホコリン (化合物26)、1-アルキル-2-(4-ニトロフェニルサクシニル)-sn-グリセロールホスホコリン (化合物27)、1-オレオイル-2-(4-ニトロフェニルサクシニル)-sn-グリセロールホスホコリン (化合物28)、1-オクタノイル-2-(4-ニトロフェニルサクシニル)-sn-グリセロールホスホコリン (化合物29)、1-デカノイル-2-(4-ニトロフェニルサクシニル)-sn-グリセロールホスホコリン (化合物30)、1-ラウロイル-2-(4-ニトロフェニルサクシニル)-sn-グリセロールホスホコリン (化合物31) が挙げられる。

Aが2である化合物 (サクシニル基を有する化合物) を基質とした場合、Aが3である化合物 (グルタリル基を有する化合物) を基質とした場合よりも、約2倍から4倍のPAF-AH活性が認められた。このことから、Aが2である化合物 (サクシニル基を有する化合物) が基質としてもっとも有効であると考えられる。

1-ミリスチル-2-(4-ニトロフェニルサクシニル)-sn-グリセロールホスホコリン (化合物8) は、Aの炭素数が3である、1-ミリスチル-2-(4-ニトロフェニルグルタリル)-sn-グリセロールホスホコリンに比べて、4倍以上も感度が上昇するという効果を有している。

本発明に用いられる基質として、上記の基質の他に、以下の基質が例示されるが、基質はこれらに限定されない。

1-オクタノイル-2-(4-ニトロフェニルグルタリル)-sn-グリセロールホスホコリン (化合物1)、

1-デカノイル-2-(4-ニトロフェニルグルタリル)-sn-グリセロ-  
-ホスホコリン (化合物2)、

1-ラウロイル-2-(4-ニトロフェニルグルタリル)-sn-グリセロ-  
-ホスホコリン (化合物3)、

5 1-ミリストイル-2-(4-ニトロフェニルグルタリル)-sn-グリセ  
ロ-ホスホコリン (化合物4)、

1-オレオイル-2-(4-ニトロフェニルグルタリル)-sn-グリセロ-  
-ホスホコリン (化合物5)、

10 1-アルキル-2-(4-ニトロフェニルグルタリル)-sn-グリセロ-  
ホスホコリン (化合物6)、

1-アルケニル-2-(4-ニトロフェニルグルタリル)-sn-グリセロ-  
-ホスホコリン (化合物7)

1-ミリストイル-2-(4-ニトロフェニルアジポイル)-sn-グリセ  
ロ-ホスホコリン (化合物9)、

15 1-ミリストイル-2-(4-ニトロフェニルピメロイル)-sn-グリセ  
ロ-ホスホコリン (化合物10)、

1-ミリストイル-2-(4-ニトロフェニルスベロイル)-sn-グリセ  
ロ-ホスホコリン (化合物11)、

20 1-ミリストイル-2-(4-ニトロフェニルアゼロイル)-sn-グリセ  
ロ-ホスホコリン (化合物12)、

1-ミリストイル-2-(2-クロロ-4-ニトロフェニルグルタリル)-  
sn-グリセロ-ホスホコリン (化合物13)、

1-ミリストイル-2-[(4-メチル)クマリルグルタリル]-sn-グ  
リセロ-ホスホコリン (化合物14)、

25 1-ミリストイル-2-(2-フルオロ-4-ニトロフェニルグルタリル)  
-sn-グリセロ-ホスホコリン (化合物15)、



- 1-ミリストイル-2-(3-フルオロ-4-ニトロフェニルグルタリル)  
-sn-グリセロ-ホスホコリン(化合物16)、  
1-ミリストイル-2-(4-ニトロチオフェニルグルタリル)-sn-グリ  
セロ-ホスホコリン(化合物17)、  
5 1-ミリストイル-2-(5-インドリルオキシグルタリル)-sn-グリ  
セロ-ホスホコリン(化合物18)、  
1-ミリストイル-2-(2,6-ジフェニル-4-ニトロフェニルグルタ  
リル)-sn-グリセロ-ホスホコリン(化合物19)、  
1-ミリストイル-2-(4-ニトロフェニルグライコリル)-sn-グリ  
セロ-ホスホコリン(化合物20)、  
10 1-ミリストイル-2-[5-ジメチルアミノ-2-(2-チアゾリルア  
ゾ)フェニルサクシニル]-sn-グリセロ-ホスホコリン(化合物21)、  
1-ミリストイル-2-[1-(2-トリアゾリルアゾ)-2-ナフチルサ  
クシニル]-sn-グリセロ-ホスホコリン(化合物22)、  
15 1-ミリストイル-2-[(4-ニトロフェニル)ジメチルサクシニル]-  
sn-グリセロ-ホスホコリン(化合物23)、  
1-ミリストイル-2-[(6-フラボンオキシル)サクシニル]-sn-  
グリセロ-ホスホコリン(化合物24)、及び  
1-パルミトイル-2-(4-ニトロフェニルグルタリル)-sn-グリセ  
ロ-ホスホコリン(化合物25)。

(本発明に用いる基質の製造方法)

本発明に用いるPAF-AHの基質は、それ自体公知の方法に準じて製造  
できる。後述の合成例で詳細が説明される。例えば、特開昭52-8962  
2号公報に記載の方法は、ホスホリパーゼA2を用いて得られる1-アシル  
グリセロホスホコリン、1-0-アルキルホスホコリン(市販のリゾPA  
25 F)、1-0-アルケニルホスホコリン(市販のリゾホスホコリンプラスマ

ローゲン) 等を出発原料として用い、これらの出発原料と無水ジカルボン酸 (例えば無水コハク酸) とを、無水クロロホルムと無水ジクロロメタン混液中、トリエチルアミンを触媒として反応させて、2位に所望のジカルボン酸を導入して、1-アシル-2-モノジカルボニル-ホスホコリンを得る。無水コハク酸を用いた場合、1-アシル-2-サクシニル-ホスホコリンが得られる。

このようにして得られた1-アシル-2-モノジカルボニル-ホスホコリンを、William N. Washburnら、J. Am. Chem. Soc. 112巻、2040-2041頁 (1990) の記載に従って、塩化オキザリルによってクロライド化し、発色団である芳香族ヒドロキシ化合物、例えばp-ニトロフェノールをトリエチルアミン存在下でエステル化し、1-アシル-2-(4-ニトロフェニルサクシニル)-ホスホコリンを得る。

また、2位にメチレン基の長いジカルボン酸を導入する場合は、無水ジカルボン酸と保護基ベンジルアルコールとの反応により得られるモノベンジルカルボン酸エステル (第4版 実験化学講座22 有機合成 I V 131頁) を用いることができる。前記の特開昭52-89622号公報に記載された方法により、モノベンジルカルボン酸エステルと1-アシルグリセロホスホコリンとを反応させて、1-アシル-2-モノベンジルカルボニルホスホコリンを得る。次いで、得られたモノベンジル体を、パラジウム/炭素を用いて、水素ガス雰囲気下で脱ベンジル化し、1-アシル-2-モノカルボニルホスホコリンを得る。このようにして得られた1-アシル-2-モノカルボニルホスホコリンを塩化オキザリルによりクロライド化し、発色団である芳香族ヒドロキシ化合物、例えばp-ニトロフェノールをトリエチルアミン存在下でエステル化し、1-アシル-2-(4-ニトロフェニルアゼロイル)-ホスホコリンを得る。

(本発明に用いる阻害剤)

本発明の測定方法としては、P A F - A Hを阻害しないが、他のエステル分解活性関連物質を阻害する阻害剤の存在下で行なう方法が好ましい。ここで、「P A F - A Hを阻害しないが、他のエステル分解活性関連物質を阻害する阻害剤」とは、P A F - A Hを阻害しないが他のエステル分解活性関連物質を阻害するという意味と、ある濃度ではP A F - A Hを阻害はしないが、他のエステル分解活性関連物質を阻害する阻害剤であるという意味の、両方の意味を含む。

P A F - A H活性の測定において、血清あるいは血漿試料中に存在する他のエステル分解活性関連物質により、非特異的に基質のエステル結合が加水分解され、一般式 ( I ) または ( I a ) における X (例えば、発色性化合物) が遊離され、P A F - A H活性のノイズとなるので好ましくない。そこで、血清あるいは血漿試料のP A F - A Hを測定する場合は、P A F - A Hを阻害しないが、他のエステル分解活性関連物質 (活性) を阻害する阻害剤 (以下、非特異反応抑制剤ということもある) を存在させることが好ましい。

このような阻害剤としては、アニオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤、胆汁酸塩、胆汁酸塩誘導体等が用いられるが、これらに限定されない。阻害剤は、1種のみ用いてもよく、2種以上組み合わせて用いてもよい。好適な組み合わせはアニオン性界面活性剤と非イオン性界面活性剤、あるいは、アニオン性界面活性剤と胆汁酸塩又は胆汁酸塩誘導体との組み合わせである。同種の阻害剤を2以上用いてもよい。

アニオン性界面活性剤としては、脂肪酸塩 (例えば、ステアリン酸ナトリウム、オレイン酸カリウム等)、アルキル硫酸エステル塩 (例えば、ラウリル硫酸ナトリウム ( S D S )、ラウリル硫酸リチウム等)、アルキルベンゼンスルホン酸塩 (例えば、ラウリルベンゼンスルホン酸ナトリウム、4 - n - オクチルベンゼンスルホン酸ナトリウム等)、アルキルナフタレンスルホン酸塩 (例えば、2 - ナフタレンスルホン酸ナトリウム等)、アルキルスル

ホコハク酸塩（例えば、ジアルキルスルホコハク酸ナトリウム等）、アルキルジフェニルエーテルジスルホン酸塩（例えば、アルキルジフェニルエーテルジスルホン酸ナトリウム等）、アルキルリン酸塩（例えば、アルキルリン酸カリウム等）、ポリオキシエチレンアルキル硫酸エステル塩（例えば、ポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸ナトリウム、ポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸トリエタノールアミン等）、ポリオキシエチレンアルキルアリル硫酸エステル塩（例えば、ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル硫酸ナトリウム等）、アルキルスルホン酸塩（例えば、オクタンスルホン酸ナトリウム、ノナンスルホン酸ナトリウム、デカンスルホン酸ナトリウム、トリデカンスルホン酸ナトリウム等）、ナフタレンスルホン酸ホルマリン縮合物（例えば、 $\beta$ -ナフタレンスルホン酸ホルマリン縮合物のナトリウム塩等）およびポリオキシエチレンアルキルリン酸エステルからなる群から選択される、少なくとも1つのアニオン性界面活性剤であることが好ましい。

非イオン性界面活性剤としては、ポリオキシエチレンアルキルエーテル（例えば、ポリオキシエチレンラウリルエーテル、ポリオキシエチレンセチルエーテル、ポリオキシエチレンステアリルエーテル、ポリオキシエチレンオレイルエーテル等）、ポリオキシエチレンアルキルアリルエーテル（例えば、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンイソオクチルフェニルエーテル（商品名 *T r i t o n* X-100（登録商標）等）、ポリオキシエチレン誘導体（ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン縮合物等）、ソルビタン脂肪酸エステル（例えば、ソルビタンモノラウレート、ソルビタンモノパルミテート、ソルビタンモノステアレート、ソルビタンモノオレエート、ソルビタントリラウレート、ソルビタントリステアレート、ソルビタントリオレエート、ソルビタンジステアレート等）、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル（例えば、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート

(商品名 Tween 20 (登録商標))、ポリオキシエチレンソルビタンモノパルミテート、ポリオキシエチレンソルビタンモノステアレート、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート、ポリオキシエチレンソルビタントリステアレート、ポリオキシエチレンソルビタントリオレエート等)、ポリオキシエチレンソルビトール脂肪酸エステル (例えば、テトラオレイン酸ポリオキシエチレンソルビット等)、グリセリン脂肪酸エステル (例えば、グリセロールモノステアレート、グリセロールモノオレエート等)、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル (例えば、ポリエチレングリコールモノラウレート、ポリエチレングリコールモノステアレート、ポリエチレングリコールモノオレエート、ポリエチレングリコールジステアレート等)、ポリオキシエチレンアルキルアミン、およびアルキルアルカノールアミドからなる群から選択される、少なくとも1つの非イオン性界面活性剤が好ましい。

胆汁酸塩並びに胆汁酸塩誘導体としてはコール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム、ケノデオキシコール酸ナトリウム、デヒドロコール酸ナトリウム、タウロコール酸ナトリウム、タウロリトコール酸ナトリウム、タウロデオキシコール酸ナトリウム、タウロケノデオキシコール酸ナトリウム、タウロウルソデオキシコール酸ナトリウム、タウロデヒドロコール酸ナトリウム、CHAPS、CHAPSO、BIGCHAPおよびデオキシBIGCHAPからなる群から選択される、少なくとも1つの胆汁酸塩並びに胆汁酸塩誘導体が好ましい。

アニオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤、胆汁酸塩または胆汁酸塩誘導体は、いずれか一つを単独で用いてもよいし、2以上組合せて用いてもよい。また、異なる種類の阻害剤を2以上組合せて用いてもよい。

(PAF-AH活性測定用試薬)

本発明のPAF-AH活性測定用試薬は、上記一般式(I)又は(Ia)で表されるPAF-AHの基質を含む。基質は、0.001mM~250m

M、より好ましくは0.01 mM～100 mM、さらに好ましくは0.01 mM～10 mMの濃度範囲で使用する。

5      なお、PAF-AH活性測定用試薬は、好適には、溶液であり、PAF-AHの基質は、各基質の安定なpHを選択して、好ましくは、pH約3～約9の緩衝液（例えば、HEPES緩衝液、クエン酸緩衝液、酒石酸緩衝液、リン酸緩衝液、酢酸緩衝液、トリス緩衝液、ホウ酸緩衝液、グッド緩衝液等）に溶解される。

10      また、本発明のPAF-AH活性測定用試薬は、好ましくは、上記非特異反応阻害剤を含む。非特異反応阻害剤の濃度は、阻害剤がPAF-AHを阻害しない場合は、特に制限はないが、PAF-AHを阻害する場合は、PAF-AHを阻害しない濃度を予め決定して、それ以下の濃度で用いればよい。

15      本発明のPAF-AH活性測定用試薬は、これらの成分以外に、PAF-AHの基質を溶解するために、必要に応じて、水混和性有機溶媒を含んでもよい。水混和性有機溶媒としては、アルコール（例えば、メタノール、エタノール、n-プロピルアルコール、イソプロピルアルコール）、ケトン（例えば、アセトン、メチルイソブチルケトン）、エステル（例えば、酢酸メチル、酢酸エチル、酢酸プロピル、プロピオン酸メチル）などが挙げられる。水混和性有機溶媒は、PAF-AHの活性に影響を与えないように、好ましくは最終の溶液重量に基づいて、約30重量%以下、より好ましくは約20重量%以下含まれる。

20      本発明のPAF-AH活性測定用試薬は、発色性あるいは蛍光発色性の化合物の解離を促進する物質を含んでもよい。これらの物質としては、 $\alpha$ -シクロデキストリン、 $\beta$ -シクロデキストリン、 $\gamma$ -シクロデキストリン、あるいはこれらのシクロデキストリンに塩基性官能基（例えば、ジエチルアミノエチル、ジメチルアミノエチル、あるいはトリメチルアンモニオエチル等の4級アンモニウム塩）を導入したシクロデキストリン類が挙げられる。こ

これらの化合物は、約0.5%含まれてもよい。

また、本発明のPAF-AH活性測定用試薬には、キレート試薬を共存させることが好ましい。キレート試薬を共存させることにより、アシルエステラーゼや $\text{Ca}^{2+}$ 依存性のホスホリパーゼ $\text{A}_2$ による、本発明に用いる基質の分解反応を抑制することができ、PAF-AH活性を特異的に測定することができるようになる。このキレート試薬としては、EDTAあるいはEGTA等の適切なキレート剤が使用できる。キレート剤は、約20mM含まれてもよい。

さらに、本発明のPAF-AH活性測定用試薬には、上記の他に、緩衝剤、安定化剤、活性化剤、賦形剤等の酵素の活性測定に一般に用いられているものを含んでいてもよい。

また、後に詳細に説明するが、本発明においては、HDL associated-PAF-AH活性、LDL associated-PAF-AH活性、及び総血清型PAF-AH活性をそれぞれ測定することができる。HDL associated-PAF-AH活性を測定するために、本発明のPAF-AH活性測定用試薬には、LDLを凝集させる物質として、アニオン性化合物（例えば、デキストラン硫酸、硫酸化シクロデキストリン、硫酸化オリゴ糖、ヘパリン、ペパラン硫酸、リンタングステン酸等）等のイオン性化合物、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、等のカチオン、ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体（例えば、抗アポリポタンパクB抗体等）等を適量含めることができる。

また、LDL associated-PAF-AHを分別定量するために、本発明のPAF-AH活性測定用試薬には、HDLを凝集させる物質として、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体（抗アポリポタンパクA抗体、抗アポリポタンパクE抗体等）を適量含めることができる。

#### (PAF-AH活性の測定)

本発明の測定方法は、上記で作成したPAF-AH活性測定用試薬にPA

F-AH活性を有する（と思われる）試料を添加して反応させ、遊離する発色性あるいは蛍光性化合物の吸光度、励起された蛍光を測定して定性的にあるいは定量的に測定する方法である。

PAF-AH活性を測定する試料としては、ヒト又は動物の血液、血清、血漿、尿もしくは羊水等の体液、そして、ヒト又は動物の細胞、臓器若しくは細胞及び臓器の抽出液等が用いられる。PAF-AH精製品及び血清、血漿等PAF-AHを含む被検試料は、pH6～9の緩衝液（例えば、HEPES緩衝液、トリス緩衝液、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、グッド緩衝液等）で適宜希釈して、20～40℃に保持して、測定反応に使用する。これらの緩衝液には、適切な塩濃度となるように、NaCl、KCl等を添加してもよい。

本発明のPAF-AHの活性測定法においては、基質の加水分解により遊離される発色性あるいは蛍光発色性の量を測定する。定量は、吸光度の測定により行なう。測定はエンド法でもレート法でも行うことができる。エンド法の場合は、まず、基質を除いた測定試薬と試料とを反応させて、検体ブランクを測定する必要がある。レート法の場合には、定量的に測定が行える時間内に吸光度の測定を行えば良い。なお、PAF-AHの活性値の算出は、遊離される発色性あるいは蛍光発色性物質の分子吸光係数より行うことができる。

また、本発明のPAF-AHの活性測定方法は、用手法でも自動分析装置を用いても行うことができる。基質から遊離される発色性または蛍光発色性の化合物の吸光度変化を測定する。例えば、発色性化合物の場合、波長280～560nmにおける吸光度変化を、また、蛍光発色性化合物の場合、レーザー光を照射して蛍光を励起させることにより分光学的に検出し、単位時間当たりの吸光度変化量を求める（いわゆるレートアッセイ法）ことで、精度良くPAF-AH活性を求めることができる。



例えば、本発明の一般式 (I) の A の炭素数が 2 である基質 (すなわち、一般式 (I a) ) の 1-ミリスチル-2-(4-ニトロフェニルサクシニル)-sn-グリセロ-ホスホコリン (化合物 8) を用いると、4-ニトロフェノールが生成する。このとき 4-ニトロフェノールの増加に伴って、4-ニトロフェノールの吸収波長である 405 nm における吸光度も定量的に増加するので、405 nm における吸光度の増加速度又は増加量が算出される。

さらに、本発明の PAF-AH 活性測定法を用いて、HDL associated-PAF-AH 活性、LDL associated-PAF-AH 活性、及び総血清型 PAF-AH 活性を分別して、それぞれ、正確に測定できる。LDL を凝集させる物質を含有する測定試薬を用いることにより、LDL を凝集、除去し、HDL associated-PAF-AH を定量することができる。また、HDL を凝集させる物質を含有する測定試薬を用いることにより、HDL を凝集、除去し、LDL associated-PAF-AH を定量することができる。どちらも添加しなければ、総血清型 PAF-AH 活性が測定される。

具体的な測定方法を以下に述べる。まず、適切な緩衝液に溶解した阻害剤を含む阻害剤試薬 (例えば、阻害剤と 150mM NaCl を含む 50mM HEPES 緩衝液 (pH7.4))、基質溶液 (例えば、16% エタノール、基質及び 150mM NaCl を含む 50mM HEPES 緩衝液 (pH7.4)) とを準備する。ヒトプール血清あるいは PAF-AH 精製品溶液の適量を阻害剤溶液と混合した後、これに基質溶液を加えて反応させる。反応の pH は、好ましくは、約 6.5 ~ 約 8.0、最も好ましくは、約 7.4 である。反応温度は、20°C ~ 40°C、好ましくは 37°C である。基質溶液添加後、適当な時間 (例えば、2 分目から 5 分目にかけて)、吸光度を測定し、単位時間当たりの吸光度の変化量を求め、発色性化合物あるいは蛍光発色性化合物の分子吸光係数から、PAF-AH 活性値 (nmol/min/ml 試料) を求めることができる。

また、レート法により自動測定する場合には、まず、上記阻害剤溶液、基質溶液を準備する。例えば、H-7170型自動分析装置（日立製作所）を用いて、測定のパラメーターに従って、測定する。ヒトプール血清あるいはPAF-AH精製品と阻害剤溶液とを混合し、一定時間後、基質溶液を混合して反応を開始する。このときの吸光度変化（タイムコース）をモニターし、反応開始後2分目から5分目にかけての単位時間（1分間）当たりの吸光度の変化量を求める。試料から得られる単位時間当りの吸光度の変化量（ $\Delta E_s$ ）と、試料の代わりに精製水を加えて得られた単位時間当りの吸光度の変化量（ $\Delta E_B$ ）、及び反応溶液における発色性化合物あるいは蛍光発色化合物の分子吸光係数（ $\epsilon$ ）から、下記式により、各血清試料のPAF-AH活性値を算出する。

$$\text{PAF-AH(nmol/min/ml)} = \frac{(\Delta E_s - \Delta E_B) \times \text{最終反応液量} \times 10^6}{\epsilon \times \text{試料量} \times \text{層長}}$$

#### （PAF-AH活性測定キット）

本発明のPAF-AH活性測定用キットは、基質、必要に応じて、非特異反応抑制剤及びその他の添加剤が添加された上記PAF-AH活性測定用試薬を含む。キットは、例えば、PAF-AH活性測定用試薬を含むアンプルの形態、PAF-AH活性測定用試薬がウェルに一定量注入された形態、あるいはPAF-AH活性測定用試薬を含む容器と測定用のウェルとを含む形態であり得る。これらの形態のキットに付属のPAF-AH活性測定用試薬に血清試料を添加することにより、PAF-AH活性が測定される。

また、本発明のPAF-AH活性測定用キットは、基質、必要に応じて、非特異反応抑制剤及びその他の添加剤が添加された上記PAF-AH活性測定用試薬を含有する試験片であり得る。試薬が溶液の場合、試薬に浸漬後、乾燥した試験片であってもよい。これを血清等に浸すことにより、定性的に

P A F - A H 活性が確認できる。また、比色表を用いておよその活性を知ることにもできる。従って、容器には、このような試験片も含まれる。

さらに、本発明のキットは、上記一般式 (I) で表される基質と、P A F - A H を阻害しないが他のエステル分解活性関連物質を阻害する阻害剤 (非特異反応抑制剤) を含有する溶液とがそれぞれ、独立した容器に充填されており、使用に際して混合されるようにされていてもよい。この場合、基質は溶液あるいは溶媒に溶解されていてもよく、基質を溶解するための溶液及び／又は溶媒が別途独立した容器に含まれてもよい。どのような形態を選択するかは、基質の安定性、操作性、使用量等を考慮して決定すればよい。

さらに、上記の基質等の他に、吸光度測定のための用具、装置等もキットに含まれ得る。

#### (実施例)

以下、実施例に基づいて、本発明をより具体的に説明するが、本発明は、この実施例によって何等限定されるものではない。

#### (実施例 1 : 基質の合成)

化合物 1 ~ 3 の合成例を以下に示す。

(化合物 1 : 1 - オクタノイル - 2 - (4 - ニトロフェニル) グルタリル - sn - グリセロールホスホコリンの合成)

1 - オクタノイル - 2 - グルタリルホスファチジルコリン 340 mg (0.68 mmol) をジクロロメタン (脱水) 3 ml に溶解し、氷冷下 2 M 塩化オキザリル 800  $\mu$  l (1.6 mmol) を加えた後、室温下 1.5 時間撹拌した。減圧濃縮後ジクロロメタン (脱水) 3 ml に溶解し室温撹拌下、4 - ニトロフェノール 104 mg (0.75 mmol)、トリエチルアミン 138 mg (190  $\mu$  L : 1.36 mmol)、ジクロロメタン (脱水) 3 ml の溶液を加えた。室温下 2.5 時間撹拌した後、減圧濃縮した。これにクロロホルム : メタノール (2 : 1) 60 ml を加え、水洗 (15 ml) した。下層を

取り、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、ろ液を濃縮し、ジエチルエーテルを加え、白濁させ一夜放置した。上澄みを取り、残渣をクロロホルム-メタノール-水系でシリカゲルカラム精製を行い、黄色油状物 218 mg (52%) を得た。

5 (化合物2: 1-デカノイル-2-(4-ニトロフェニルグルタリル)-sn-グリセロールホスホコリンの合成)

1-デカノイル-2-グルタリルホスファチジルコリン 272 mg (0.55 mmol) をジクロロメタン (脱水) 3 ml に溶解し、氷冷下 2 M 塩化オキザリル 550  $\mu$ l (1.1 mmol) を加えた後、室温下 1.5 時間撹拌した。減圧濃縮後ジクロロメタン (脱水) 3 ml に溶解し、室温撹拌下、4-ニトロフェノール 84 mg (0.6 mmol)、トリエチルアミン 111 mg (153  $\mu$ L: 1.1 mmol)、ジクロロメタン (脱水) 3 ml の溶液を加えた。室温下 2.5 時間撹拌した後、減圧濃縮した。これにクロロホルム:メタノール (2:1) 60 ml を加え、水洗 (15 ml) した。下層を取り、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、ろ液を濃縮しメタノールでシリカゲルカラム精製をし、さらにクロロホルム-メタノール-水系でシリカゲルカラム精製を行い、黄色アモルファス晶 114 mg (32%) を得た。

15 (化合物3: 1-ラウロイル-2-(4-ニトロフェニルグルタリル)-sn-グリセロールホスホコリンの合成)

20 1-ラウロイル-2-グルタリルホスファチジルコリン 290 mg (0.52 mmol) をジクロロメタン (脱水) 3 ml に溶解し、氷冷下 2 M 塩化オキザリル 520  $\mu$ l (1.04 mmol) を加えた後、室温下 1.5 時間撹拌した。減圧濃縮後ジクロロメタン (脱水) 3 ml に溶解し室温撹拌下、4-ニトロフェノール 79 mg (0.57 mmol)、トリエチルアミン 105 mg (145  $\mu$ L: 1.04 mmol)、ジクロロメタン (脱水) 3 ml の溶液を加えた。室温下 2.5 時間撹拌した後、減圧濃縮した。これにクロロホ

ルム：メタノール（2：1）60 ml を加え、水洗（15 ml）した。下層を取り、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、ろ液を濃縮しクロロホルム－メタノール－水系でシリカゲルカラム精製を行い、目的画分 171 mg（49%）を得た。

5 (化合物4：1－ミリストイル－2－（4－ニトロフェニルグルタリル）－sn－グリセローホスホコリンの合成)

1－ミリストイル－2－グルタリルホスファチジルコリン 283 mg（0.49 mmol）をクロロホルム（脱水）3 ml に溶解し、氷冷下 2 M 塩化オキザリル 490  $\mu$ l（0.98 mmol）を加えた後、室温下 1.5 時間撹拌した。減圧濃縮後クロロホルム（脱水）3 ml に溶解し室温撹拌下、4－ニトロフェノール 102.1 mg（0.74 mmol）、トリエチルアミン 99 mg（136  $\mu$ L：0.98 mmol）、クロロホルム（脱水）3 ml の溶液を加えた。室温下 2 時間撹拌した後、0.1 規定塩酸 1 ml を加えた。この溶液にクロロホルム：メタノール（2：1）75 ml を加え、水洗（15 ml）した。下層を取り、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、ろ液を濃縮し、クロロホルム－メタノール－水系でシリカゲルカラム精製を行い、黄色アモルファス 182 mg（53%）を得た。

15 NMR (CDCl<sub>3</sub>) : 0.89(t, 3H, J=7.0Hz) , 1.25(s, 20H), 1.50-1.65(m, 2H), 1.95-2.12 (m, 2H), 2.29(t, 2H, J=7.7 Hz), 2.40-2.55(m, 2H), 2.71(t, 2H, J=7.3 Hz) , 3.38(s, 9H), 3.80(br, 2H), 3.92-4.05(m, 2H), 4.10-4.20(m, 1H), 4.25-4.45(m, 3H), 5.15-5.30(m, 1H), 7.31(d, 2H), 8.29(d, 2H) ;  
20 MS(SIMS) : 703(MH<sup>+</sup>)

(化合物5：1－オレオイル－2－（4－ニトロフェニルグルタリル）－sn－グリセローホスホコリンの合成)

25 1－オレオイル－2－グルタリルホスファチジルコリン 350 mg（0.55 mmol）をジクロロメタン（脱水）3 ml に溶解し、氷冷下 2 M 塩化オ

キザリル  $550\ \mu\text{l}$  ( $1.1\ \text{mmol}$ ) を加えた後、室温下  $1.5$  時間撹拌した。減圧濃縮後ジクロロメタン (脱水)  $3\ \text{ml}$  に溶解し室温撹拌下、4-ニトロフェノール  $84\ \text{mg}$  ( $0.61\ \text{mmol}$ )、トリエチルアミン  $111\ \text{mg}$  ( $153\ \mu\text{L}$  :  $1.1\ \text{mmol}$ )、ジクロロメタン (脱水)  $3\ \text{ml}$  の溶液を加えた。室温下  $2.5$  時間撹拌した後、減圧濃縮した。これにクロロホルム：メタノール ( $2:1$ )  $60\ \text{ml}$  を加え、水洗 ( $15\ \text{ml}$ ) した。下層を取り、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、ろ液を濃縮し、クロロホルム-メタノール-水系でシリカゲルカラム精製を行い、目的画分  $303\ \text{mg}$  ( $73\%$ ) を得た。

(化合物 6 : 1-アルキル-2-(4-ニトロフェニルグルタリル)-sn-グリセロールホスホコリンの合成)

まず、1-アルキル-2-ヒドロキシ-sn-グリセロール-3-ホスファチジルコリン (リゾ-PAF : AVANTI POLAR LIPIDS、INC (略称、AVT) 製 : アルキル鎖は、主に  $\text{C}_{16}$  と  $\text{C}_{18}$ ) を用いて、常法により 1-アルキル-2-グルタリルホスファチジルコリンを作製した。

得られた 1-アルキル-2-グルタリルホスファチジルコリン  $267\ \text{mg}$  ( $0.45\ \text{mmol}$ ) をジクロロメタン (脱水)  $3\ \text{ml}$  に溶解し、氷冷下  $2\ \text{M}$  塩化オキザリル  $450\ \mu\text{l}$  ( $0.9\ \text{mmol}$ ) を加えた後、室温下  $1.5$  時間撹拌した。減圧濃縮後ジクロロメタン (脱水)  $3\ \text{ml}$  に溶解し室温撹拌下、4-ニトロフェノール  $69\ \text{mg}$  ( $0.5\ \text{mmol}$ )、トリエチルアミン  $90.9\ \text{mg}$  ( $125\ \mu\text{L}$  :  $0.9\ \text{mmol}$ )、ジクロロメタン (脱水)  $3\ \text{ml}$  の溶液を加えた。室温下  $2.5$  時間撹拌した後、減圧濃縮した。これにクロロホルム：メタノール ( $2:1$ )  $60\ \text{ml}$  を加え、水洗 ( $15\ \text{ml}$ ) した。下層を取り、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、ろ液を濃縮し、メタノールでシリカゲルカラム精製をし、さらにクロロホルム-メタノール-水系でシリカゲルカラム精製を行い、黄色アモルファス晶  $146\ \text{mg}$  ( $45\%$ ) を得た。

(化合物7：1-アルケニル-2-(4-ニトロフェニルグルタリル)-  
sn-グリセロールホスホコリンの合成)

まず、リゾホスファチジルコリンプラスマロゲン (DOOSAN SER  
DARY RESEARCH LABORATORIES (略称SRL)  
5 製：アルケニル鎖は、主にC<sub>16</sub>とC<sub>18</sub>)を用いて、常法により1-アルケ  
ニル-2-グルタリルホスファチジルコリンを作製した。ついで、この1-  
アルケニル-2-グルタリルホスファチジルコリン137mg (0.23m  
mol)を出発原料として、化合物6と同様の方法で合成を行い、黄色アモ  
ルファス晶98mg (60%)を得た。

10 (化合物8：1-ミリストイル-2-(4-ニトロフェニルサクシニル)-  
sn-グリセロールホスホコリンの合成)

1-ミリストイル-2-サクシニルホスファチジルコリン200mg (0.  
35mmol)をジクロロメタン(脱水)3mlに溶解し、氷冷下2M塩化  
オキサリル350μl (0.71mmol)を加えた後、室温下1.5時間攪拌  
15 した。減圧濃縮後ジクロロメタン(脱水)3mlに溶解し室温攪拌下、4-  
ニトロフェノール54mg (0.39mmol)、トリエチルアミン71.7  
mg (99μl : 0.71mmol)、クロロホルム(脱水)3mlの溶液を  
加えた。室温下1.5時間攪拌した後この溶液にクロロホルム：メタノール  
(2:1)60mlを加え、水洗(15ml)した。下層を取り、無水硫酸ナ  
20 トリウムで乾燥後ろ液を濃縮し、クロロホルム-メタノール-水系でシリカ  
ゲルカラム精製を行い、淡黄色油状物154mg (64%)を得た。

NMR (CDCl<sub>3</sub>) : 0.80-0.95(m, 3H), 1.26(br, 20H), 1.57(br, 2H), 2.22-2.29  
(m, 2H), 2.75-2.82(m, 2H), 2.82-2.93(m, 2H), 3.34(s, 9H), 3.79(br, 2H),  
4.01(br, 2H), 4.10-4.22(m, 1H), 4.22-4.48(m, 4H), 5.27(br, 1H), 7.30-7.  
25 36(m, 2H), 8.27-8.32(m, 2H) ; MS(SIMS) : 689(MH<sup>+</sup>)

(化合物9：1-ミリストイル-2-(4-ニトロフェニルアジポイル)

－s n－グリセローホスホコリンの合成)

1－ミリストイル－2－アジポイルホスファチジルコリン 265 mg (0.45 mmol) を出発原料として、化合物 8 の合成と同様の方法で合成を行い、1－ミリストイル－2－(4－ニトロフェニルアジポイル)－s n－グリセローホスホコリンの黄色油状物 167 mg (52%) を得た。

(化合物 10 : 1－ミリストイル－2－(4－ニトロフェニルピメロイル)－s n－グリセローホスホコリンの合成)

1－ミリストイル－2－ピメロイルホスファチジルコリン 347 mg (0.57 mmol) を出発原料として、化合物 8 の合成と同様の方法で合成を行い、1－ミリストイル－2－(4－ニトロフェニルピメロイル)－s n－グリセローホスホコリンの黄色油状物 341 mg (82%) を得た。

(化合物 11 : 1－ミリストイル－2－(4－ニトロフェニルスベロイル)－s n－グリセローホスホコリンの合成)

1－ミリストイル－2－スベロイルホスファチジルコリン 284 mg (0.46 mmol) を出発原料とし、化合物 8 の合成と同様の方法で合成を行い、1－ミリストイル－2－(4－ニトロフェニルスベロイル)－s n－グリセローホスホコリンの黄色油状物 114 mg (34%) を得た。

(化合物 12 : 1－ミリストイル－2－(4－ニトロフェニルアゼロイル)－s n－グリセローホスホコリンの合成)

1－ミリストイル－2－アゼロイルホスファチジルコリン 210 mg (0.33 mmol) を出発原料とし、化合物 8 の合成と同様の方法で合成を行い、1－ミリストイル－2－(4－ニトロフェニルアゼロイル)－s n－グリセローホスホコリンの黄色油状物 190 mg (76%) を得た。

NMR (CDCl<sub>3</sub>) : 0.89 (m, 3H) , 1.20-1.50 (m, 26H) , 1.60 (br, 4H) , 1.70-1.85 (m, 2H) , 2.30 (m, 4H) , 2.61 (t, 2H, J=7.46 Hz) , 3.38 (s, 9H) , 3.83 (br, 2H) , 3.90-4.02 (m, 2H) , 4.10-4.22 (m, 1H) , 4.25-4.50 (m, 3H) , 5.23 (br, 1H) , 7.



21-7.35 (m, 2H), 8.20-8.35 (m, 2H)。

(化合物 13 : 1-ミリストイル-2-(2-クロロ-4-ニトロフェニル  
グルタルル) -sn-グリセローホスホコリンの合成)

1-ミリストイル-2-グルタルルホスファチジルコリン 177 mg (0.  
3 mmol) をジクロロメタン (脱水) 3 ml に溶解し、氷冷下 2 M 塩化オ  
キザリル 300  $\mu$  l (0.6 mmol) を加えた後、室温下 2 時間撹拌した。  
減圧濃縮後ジクロロメタン (脱水) 3 ml に溶解し室温撹拌下、2-クロロ-  
4-ニトロフェノール 104 mg (0.6 mmol)、トリエチルアミン 8  
4  $\mu$  l (0.6 mmol)、ジクロロメタン (脱水) 3 ml の溶液を加えた。室  
温下 3 日間撹拌した後、減圧濃縮した。これにクロロホルム：メタノール  
(2:1) 60 ml を加え、水洗 (15 ml) した。下層を取り、無水硫酸ナ  
トリウムで乾燥後、ろ液を濃縮し、クロロホルム-メタノール-水系でシリ  
カゲルカラム精製を行い、黄色油状物 156 mg (71%) を得た。

(化合物 14 : 1-ミリストイル-2-[ (4-メチル) クマリルグルタ  
リル] -sn-グリセローホスホコリンの合成)

1-ミリストイル-2-グルタルルホスファチジルコリン 191 mg (0.  
33 mmol) をジクロロメタン (脱水) 3 ml に溶解し、氷冷下 2 M 塩化  
オキザリル 328  $\mu$  l (0.67 mmol) を加えた後、室温下 2 時間撹拌し  
た。減圧濃縮後ジクロロメタン (脱水) 3 ml に溶解し室温撹拌下、4-  
(メチル) クマリン 115 mg (0.67 mmol)、トリエチルアミン 9  
1.4  $\mu$  l (0.67 mmol)、ジクロロメタン (脱水) 3 ml の溶液を加え  
た。室温下 4 日間撹拌した後、減圧濃縮した。これにクロロホルム：メタノ  
ール (2:1) 60 ml を加え、水洗 (15 ml) した。下層を取り、無水硫  
酸ナトリウムで乾燥後、ろ液を濃縮し、クロロホルム-メタノール-水系で  
シリカゲルカラム精製を行い、無色アモルファス 183.2 mg (76.  
5%) を得た。

NMR (CDCl<sub>3</sub>) : 0.89 (t, 3H, J=6.9 Hz), 1.25 (br, 20H), 1.50-1.65 (m, 2H),  
1.95-2.12 (m, 2H), 2.29 (t, 2H, J=7.7 Hz), 2.44 (s, 3H), 2.47-2.51 (m, 2H),  
2.70 (t, 2H, J=7.2 Hz), 3.38 (s, 9H), 3.82 (br, 2H), 3.98-4.03 (m, 2H), 4.11-  
4.22 (m, 1H), 4.30-4.48 (m, 3H), 5.19-5.32 (m, 1H), 6.27 (s, 1H), 7.00-7.11  
5 (m, 1H), 7.11-7.20 (m, 1H), 7.58-7.70 (m, 1H) ; MS (SIMS) : 726 (MH<sup>+</sup>)

(化合物 15 : 1-ミリストイル-2-(2-フルオロ-4-ニトロフェ  
ニルグルタリル) -sn-グリセロールホスホコリンの合成)

1-ミリストイル-2-グルタリルホスファチジルコリン 266 mg (0.  
46 mmol) をクロロホルム (脱水) 3 ml に溶解し、氷冷下 2 M 塩化オ  
10 キザリル 457 μl (0.91 mmol) を加えた後、室温下 1.5 時間撹拌し  
た。減圧濃縮後クロロホルム (脱水) 3 ml に溶解し室温撹拌下、2-フル  
オロ-4-ニトロフェノール 107.7 mg (0.69 mmol)、トリエチ  
ルアミン 127.4 μL (0.91 mmol)、クロロホルム (脱水) 3 ml の  
溶液を加えた。室温下 3 時間撹拌した後、0.1 規定塩酸 1 ml を加えた。  
15 この溶液にクロロホルム : メタノール (2 : 1) 70 ml を加え、水洗 (15  
ml) した。下層を取り、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、ろ液を濃縮し、ク  
ロロホルム-メタノール-水系でシリカゲルカラム精製を行い、黄色アモル  
ファス 260 mg (79%) を得た。

(化合物 16 : 1-ミリストイル-2-(3-フルオロ-4-ニトロフェ  
20 ニルグルタリル) -sn-グリセロールホスホコリンの合成)

1-ミリストイル-2-グルタリルホスファチジルコリン 223 mg (0.  
38 mmol) を出発原料とし、化合物 15 の合成と同様の方法で合成を行  
い、1-ミリストイル-2-(3-フルオロ-4-ニトロフェニルグルタリ  
ル) -sn-グリセロールホスホコリンの黄色アモルファス晶 171 mg  
25 (62%) を得た。

(化合物 17 : 1-ミリストイル-2-(4-ニトロチオフェニル) グル

タリルホスファチジルコリンの合成)

1-ミリストイル-2-グルタリルホスファチジルコリン 227 mg (0.39 mmol) をクロロホルム (脱水) 3 ml に溶解し、氷冷下 2 M 塩化オキザリル 390  $\mu$ l (0.78 mmol) を加えた後、室温下 2 時間撹拌した。

- 5 減圧濃縮後クロロホルム (脱水) 3 ml に溶解し室温撹拌下、4-ニトロチオフエノール 90.8 mg (0.59 mmol)、トリエチルアミン 108.3  $\mu$ l (0.78 mmol)、クロロホルム (脱水) 3 ml の溶液を加えた。室温下 2 時間撹拌した後、0.1 規定塩酸 1 ml を加えた。この溶液にクロロホルム：メタノール (2:1) 70 ml を加え、水洗 (15 ml) した。下層を取り、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、ろ液を濃縮し、クロロホルム-メタノール-水系でシリカゲルカラム精製を行い、褐色油状物 202 mg (72%) を得た。
- 10

- NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 0.80-0.98 (m, 3H), 1.27 (br, 20H), 1.59 (br, 2H), 1.92-2.12 (m, 2H), 2.20-2.35 (m, 2H), 2.35-2.52 (m, 2H), 2.70-2.88 (m, 2H), 3.37 (s, 9H), 3.82 (br, 2H), 3.90-4.02 (m, 2H), 4.02-4.20 (m, 1H), 4.22-4.47 (m, 3H), 5.22 (br, 1H), 7.51-7.65 (m, 2H), 8.15-8.31 (m, 2H); MS (SIMS): 719 ( $\text{MH}^+$ ).
- 15

(化合物 18: 1-ミリストイル-2-(5-インドリルオキシグルタリル)-sn-グリセロールホスホコリンの合成)

- 1-ミリストイル-2-グルタリルホスファチジルコリン 205 mg (0.35 mmol) をクロロホルム (脱水) 3 ml に溶解し、氷冷下 2 M 塩化オキザリル 352  $\mu$ l (0.7 mmol) を加えた後、室温下 2 時間撹拌した。減圧濃縮後クロロホルム (脱水) 3 ml に溶解し室温撹拌下、5-ヒドロキシインドール 70.4 mg (0.53 mmol)、トリエチルアミン 98.2  $\mu$ l (0.7 mmol)、クロロホルム (脱水) 3 ml の溶液を加えた。室温下 2 時間撹拌した後、0.1 規定塩酸 1 ml を加えた。この溶液にクロロホルム：メタノール (2:1) 70 ml を加え、水洗 (15 ml) した。下層を取
- 20
- 25

り、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、ろ液を濃縮しクロロホルム-メタノール-水系でシリカゲルカラム精製を行い、黄色油状物 143 mg (59%) を得た。

NMR (CDCl<sub>3</sub>) : 0.80-1.00 (m, 3H), 1.20-1.40 (m, 20H), 1.50-1.65 (m, 2H), 1.91-2.15 (m, 2H), 2.18-2.35 (m, 2H), 2.35-2.51 (m, 2H), 2.51-2.70 (m, 2H), 2.78 (s, 9H), 3.00-3.29 (m, 3H), 3.89-4.27 (m, 5H), 4.27-4.50 (m, 1H), 5.21 (br, 1H), 6.41 (s, 1H), 6.70-6.90 (m, 1H), 7.21 (s, 1H), 7.40-7.65 (m, 1H), 11.18 (s, 1H) ; MS (SIMS) : 697 (MH<sup>+</sup>)。

(化合物 19 : 1-ミリストイル-2-(2,6-ジフェニル-4-ニトロフェニル)グルタリル)-sn-グリセロールホスホコリンの合成

1-ミリストイル-2-グルタリルホスファチジルコリン 254 mg (0.44 mmol) をクロロホルム (脱水) 3 ml に溶解し、氷冷下 2 M 塩化オキザリル 437  $\mu$ l (0.87 mmol) を加えた後、室温下 2 時間攪拌した。減圧濃縮後クロロホルム (脱水) 3 ml に溶解し、室温攪拌下、2,6-ジフェニル-4-ニトロフェノール 191 mg (0.65 mmol)、トリエチルアミン 122  $\mu$ l (0.87 mmol)、クロロホルム (脱水) 3 ml の溶液を加えた。室温下 16 時間攪拌した後、0.1 規定塩酸 1 ml を加えた。この溶液にクロロホルム : メタノール (2 : 1) 70 ml を加え、水洗 (15 ml) した。下層を取り、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、ろ液を濃縮し、クロロホルム-メタノール-水系でシリカゲルカラム精製を行い、黄色油状物 219 mg (58%) を得た。

NMR (CDCl<sub>3</sub>) : 0.89 (t, 3H, J=7.2 Hz), 1.26 (br, 20H), 1.26-1.61 (m, 4H), 1.91 (t, 2H, J=7.6 Hz), 2.14 (t, 2H, J=7.1 Hz), 2.26 (t, 2H, J=7.8 Hz), 3.31 (s, 9H), 3.74 (br, 2H), 3.92 (t, 2H, J=6.0 Hz), 4.00-4.15 (m, 1H), 4.28 (br, 2H), 4.30-4.42 (m, 1H), 5.14 (br, 1H), 7.32-7.50 (m, 10H), 8.28 (s, 2H) ; MS (SIMS) : 855 (MH<sup>+</sup>)。

(化合物 20 : 1-ミリストイル-2-(4-ニトロフェニルグリコリル)-sn-グリセロ-ホスホコリンの合成)

1-ミリストイル-2-グリコリルホスファチジルコリン 164mg (0.28mmol) をクロロホルム (脱水) 3ml に溶解し、氷冷下 2M 塩化オキザリル 281 $\mu$ l (0.56mmol) を加えた後、室温下 2 時間攪拌した。減圧濃縮後クロロホルム (脱水) 3ml に溶解し室温攪拌下、4-ニトロフェノール 43.0mg (0.31mmol)、トリエチルアミン 78 $\mu$ L (0.56mmol)、クロロホルム (脱水) 3ml の溶液を加えた。室温下 2 時間攪拌した後、0.1 規定塩酸 1ml を加えた。この溶液にクロロホルム：メタノール (2:1) 56ml を加え、水洗 (14ml) した。下層を取り、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、ろ液を濃縮し、クロロホルム-メタノール-水系でシリカゲルカラム精製を行い、黄色油状物 102mg (51%) を得た。

(化合物 21 : 1-ミリストイル-2-[5-ジメチルアミノ-2-(2-チアゾリルアゾ)フェニルサクシニル]-sn-グリセロ-ホスホコリンの合成)

1-ミリストイル-2-サクシニルホスファチジルコリン 419mg (0.74mmol) をクロロホルム (脱水) 6ml に溶解し、氷冷下 2M 塩化オキザリル 738 $\mu$ l (1.48mmol) を加えた後、室温下 2.5 時間攪拌した。減圧濃縮後クロロホルム (脱水) 6ml に溶解し室温攪拌下、5-ジメチルアミノ-2-(2-チアゾリルアゾ)フェノール 202mg (0.81mmol)、トリエチルアミン 206 $\mu$ L (1.48mmol)、クロロホルム (脱水) 6ml の溶液を加えた。室温下 2 時間攪拌した後、0.1 規定塩酸 2ml を加えた。この溶液にクロロホルム：メタノール (2:1) 150ml を加え、水洗 (30ml) した。下層を取り、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、ろ液を濃縮し、クロロホルム-メタノール-水系でシリカゲルカラム精製を行い、赤色油状物 247mg (42%) を得た。

(化合物 22 : 1-ミリストイル-2-[1-(2-トリアゾリルアゾ)-2-ナフチルサクシニル]-sn-グリセローホスホコリンの合成)

1-ミリストイル-2-サクシニルホスファチジルコリン 330 mg (0.58 mmol) を出発原料とし、化合物 21 の合成と同様の方法で合成を行い、1-ミリストイル-2-[1-(2-トリアゾリルアゾ)-2-ナフチルサクシニル]-sn-グリセローホスホコリンの赤褐色油状物 64 mg (14%) を得た。

(化合物 23 : 1-ミリストイル-2-[(4-ニトロフェニル)ジメチルサクシニル]-sn-グリセローホスホコリンの合成)

ジメチルサクシニルホスファチジルコリン 256 mg (0.43 mmol) を出発原料とし、化合物 21 の合成と同様の方法で合成を行い、1-ミリストイル-2-[(4-ニトロフェニル)ジメチルサクシニル]-sn-グリセローホスホコリンの白色アモルファス晶 150 mg (49%) を得た。

(化合物 24 : 1-ミリストイル-2-[(6-フラボンオキシル)サクシニル]-sn-グリセローホスホコリンの合成)

1-ミリストイル-2-サクシニルホスファチジルコリン 310 mg (0.55 mmol) を出発原料とし、1-ミリストイル-2-[(6-フラボンオキシル)サクシニル]-sn-グリセローホスホコリンの白色アモルファス晶 295 mg (68%) を得た。

NMR (CDCl<sub>3</sub>) : 0.87 (t, 3H, J=6.9 Hz), 1.24 (br, 20H), 1.46-1.64 (m, 2H), 2.25 (t, 2H, J=7.7 Hz), 2.65-3.09 (m, 6H), 3.33 (s, 9H), 3.78 (br, 2H), 4.00 (t, 2H, J=6.7 Hz), 4.09-4.20 (m, 1H), 4.23-4.43 (m, 3H), 5.17-5.31 (m, 1H), 5.41-5.56 (m, 1H), 7.10-7.65 (m, 8H)。

(化合物 25 : 1-パルミトイル-2-(4-ニトロフェニルグルタリル)-sn-グリセローホスホコリンの合成)

1-パルミトイル-2-グルタリルホスファチジルコリン 320 mg (0.51

mmol) をジクロロメタン (脱水) 3 ml に溶解し、氷冷下 2 M 塩化オキザリル 765  $\mu$  l (1.53 mmol) を加えた後、室温下 1.5 時間攪拌した。減圧濃縮後ジクロロメタン (脱水) 3 ml に溶解し室温攪拌下、4-ニトロフェノール 104 mg (0.75 mmol)、トリエチルアミン 139  $\mu$  l (1.02 mmol)、ジクロロメタン (脱水) 3 ml の溶液を加えた。室温下 2.5 時間攪拌した後、減圧濃縮した。これにクロロホルム：メタノール (2:1) 75 ml を加え、水洗 (15 ml) した。下層を取り、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、ろ液を濃縮した。残渣を、クロロホルム-メタノール-水系でシリカゲルカラム精製を行い、黄色アモルファス 203.6 mg (55%) を得た。

(化合物 26 : 1-パルミトイル-2-(4-ニトロフェニルサクシニル)-sn-グリセロールホスホコリンの合成)

1-パルミトイル-2-サクシニルホスファチジルコリン 217 mg (0.36 mmol) をクロロホルム (脱水) 5 ml に溶解し、氷冷下 2 M 塩化オキザリル 365  $\mu$  l (0.73 mmol) を加えた後、室温下 1.5 時間攪拌した。減圧濃縮後クロロホルム (脱水) 5 ml に溶解し室温攪拌下、4-ニトロフェノール 55.8 mg (0.40 mmol)、トリエチルアミン 74 mg (102  $\mu$  l : 0.73 mmol)、クロロホルム (脱水) 3 ml の溶液を加えた。室温下 17 時間攪拌した後、減圧濃縮した。これにクロロホルム：メタノール (2:1) 75 ml を加え、水洗 (14 ml) した。下層を取り、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、ろ液を濃縮し、残渣をクロロホルム-メタノール-水系でシリカゲルカラム精製を行い、黄色アモルファス 160 mg (62%) を得た。

NMR(CDCl<sub>3</sub>): 0.88(t, 3H, J=6.9Hz), 1.20-1.39(m, 24H), 1.48-1.63(m, 2H), 2.20-2.35(m, 2H), 2.70-2.82(m, 2H), 2.85-2.98(m, 2H), 3.32(s, 9H), 3.72-3.85(m, 2H), 4.00(t, 2H, J=7.0Hz), 4.08-4.21(m, 1H), 4.25-4.45(m, 3H), 5.15-5.35(m, 1H), 7.28-7.31(m, 2H), 8.25-8.30(m, 2H)

(化合物 27 : 1-アルキル-2-(4-ニトロフェニルサクシニル)-sn-グリセロールホスホコリンの合成)

まず、1-アルキル-2-ヒドロキシ-sn-グリセロール-3-ホスファチジルコリン (リゾ-PAF : アルキル鎖は、主に C<sub>16</sub> と C<sub>18</sub>) を用いて、  
5 常法により 1-アルキル-2-サクシニルホスファチジルコリンを作製した。

得られた 1-アルキル-2-サクシニルホスファチジルコリン 189 mg (0.33 mmol) を出発原料として、化合物 26 の合成と同様の方法で合成し 1-アルキル-2-(4-ニトロフェニルサクシニル)-sn-グリセロールホスホコリンの褐色アモルファス晶 159 mg (69%) を得た。

10 NMR(CDCl<sub>3</sub>) : 0.82-0.95 (m, 3H), 1.18-1.39 (m, 28H), 1.40-1.69 (m, 2H), 2.25 (t, 2H, J=7.8Hz), 2.70-2.82 (m, 2H), 2.82-2.92 (m, 2H), 3.32 (s, 9H), 3.77 (br, 2H), 4.00 (t, 2H, J=7.0Hz), 4.08-4.22 (m, 1H), 4.22-4.45 (m, 3H), 5.15-5.33 (m, 1H), 7.29-7.34 (m, 2H), 8.24-8.30 (m, 2H)

(化合物 28 : 1-オレオイル-2-(4-ニトロフェニルサクシニル)-sn-グリセロールホスホコリンの合成)  
15

1-オレオイル-2-サクシニルホスファチジルコリン 229 mg (0.37 mmol) を出発原料として、化合物 26 の合成と同様の方法で合成し、1-オレオイル-2-(4-ニトロフェニルサクシニル)-sn-グリセロールホスホコリンの黄色アモルファス晶 232 mg (85%) を得た。

20 NMR(CDCl<sub>3</sub>) : 0.88 (t, 3H, J=6.9Hz), 1.15-1.40 (m, 20H), 1.55 (t, 2H, J=6.8Hz), 1.59-2.08 (m, 4H), 2.25 (t, 2H, J=7.7Hz), 2.70-2.81 (m, 2H), 2.83-2.94 (m, 2H), 3.32 (s, 9H), 3.77 (br, 2H), 4.00 (t, 2H, J=5.7Hz), 4.08-4.21 (m, 1H), 4.29 (br, 2H), 4.33-4.48 (m, 1H), 5.16-5.40 (m, 3H), 7.28-7.34 (m, 2H), 8.24-8.30 (m, 2H)

25 (化合物 29 : 1-オクタノイル-2-(4-ニトロフェニルサクシニル)-sn-グリセロールホスホコリンの合成)



1-オクタノイル-2-サクシニルホスファチジルコリン 151 mg (0.33 mmol) を出発原料として、化合物 26 の合成と同様の方法で合成し、1-オクタノイル-2-(4-ニトロフェニルサクシニル)-sn-グリセロ-ホスホコリンの黄色油状物 159 mg (80%) を得た。

5 NMR(CDCl<sub>3</sub>): 0.87(t, 3H, J=7.0Hz), 1.10-1.38(m, 8H), 1.43-1.65(m, 2H), 2.25(t, 2H, J=7.5Hz), 2.65-2.81(m, 2H), 2.81-2.95(m, 2H), 3.33(s, 9H), 3.77(br, 2H), 3.89-4.05(m, 2H), 4.08-4.20(m, 2H), 4.20-4.32(m, 1H), 4.32-4.45(m, 3H), 5.10-5.30(m, 1H), 7.31(d, 2H), 8.27(d, 2H)

10 (化合物 30: 1-デカノイル-2-(4-ニトロフェニルサクシニル)-sn-グリセロ-ホスホコリンの合成)

1-デカノイル-2-サクシニルホスファチジルコリン 247 mg (0.52 mmol) を出発原料として、化合物 26 の合成と同様の方法で合成し、1-デカノイル-2-(4-ニトロフェニルサクシニル)-sn-グリセロ-ホスホコリンの黄色アモルファス晶 208 mg (64%) を得た。

15 NMR(CDCl<sub>3</sub>): 0.87(t, 3H, J=6.9Hz), 1.25(s, 12H), 1.45-1.65(m, 2H), 2.25(t, 2H, J=7.7Hz), 2.65-2.82(m, 2H), 2.85-2.95(m, 2H), 3.33(s, 9H), 3.77(br, 2H), 3.99(t, 2H, J=5.5Hz), 4.08-4.22(m, 1H), 4.25-4.48(m, 3H), 5.20-5.30(m, 1H), 7.27-7.35(m, 2H), 8.22-8.30(m, 2H)

20 (化合物 31: 1-ラウロイル-2-(4-ニトロフェニルサクシニル)-sn-グリセロ-ホスホコリンの合成)

1-ラウロイル-2-サクシニルホスファチジルコリン 256 mg (0.5 mmol) を出発原料として、化合物 26 の合成と同様の方法で合成し、1-ラウロイル-2-(4-ニトロフェニルサクシニル)-sn-グリセロ-ホスホコリンの黄色油状物 176 mg (53%) を得た。

25 NMR(CDCl<sub>3</sub>): 0.87(t, 3H, J=7.0Hz), 1.15-1.36(m, 16H), 1.49-1.62(m, 2H), 2.25(t, 2H, J=7.7Hz), 2.70-2.81(m, 2H), 2.85-3.00(m, 2H), 3.33(s, 9H), 3.77

(br, 2H), 4.00 (t, 2H,  $J=5.6\text{Hz}$ ), 4.11-4.22 (m, 1H), 4.25-4.42 (m, 3H), 5.20-5.30 (m, 1H), 7.28-7.35 (m, 2H), 8.23-8.31 (m, 2H)

(実施例2: PAF-AH活性の測定; 基質特異性)

(酵素PAF-AHの精製例)

5 ヒト血漿約400mlをKBrで比重 $d=1.063$ に調製し、遠心分離して、カイロミクロン、VLDL、及びLDLを含む画分を得た。10mM CHAPSを含む50mM トリス-塩酸 (Tris-HCl) 緩衝液 (pH 7.4) で透析後、予め10mM CHAPSを含む50mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.4) で平衡化したQセファロースカラムに付した。同じ緩衝液でカラムを洗浄した後、NaCl (0-0.5M) の直線グラジエントにより溶出した。溶出されたPAF-AH活性部分をセントリップ30で濃縮し、10mM CHAPS, 0.3M NaClを含む50mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.4) で平衡化したセファクリルS-200に付した。同じ緩衝液で溶出させたPAF-AH活性部分をセントリップ30で濃縮すると共に緩衝液を10mM CHAPS, 0.3M NaClを含む25mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.4) で平衡化したブルーセファロースカラムに付した。同じ緩衝液で洗浄した後、10mM CHAPS, 1.5M NaClを含む50mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) で溶出した。PAF-AH活性部分をセントリップ30で濃縮し、精製PAF-AHとした。

20 (活性の測定)

上記合成した化合物1~13、15~17、20及び25について、PAF-AH活性を測定した。

以下の溶液、

25 緩衝液: 150mM NaCl、10mM EDTAを含む50mM HEPES緩衝液 (pH7.4); 及び、

基質溶液: 4mMの基質、90mM NaCl、6mM EDTA、及び4

0%エタノールを含む30mM HEPES緩衝液(pH7.4)を調製した。

上記方法で得られたPAF-AH精製品10 $\mu$ lと緩衝液900 $\mu$ lとを混合し、37℃の恒温槽に5分放置した後、基質溶液を100 $\mu$ l添加して、反応を開始した。基質溶液添加後、2分目から5分目にかけての単位時間(1分間)当たりの吸光度の変化量( $\Delta E_s$ )とパラニトロフェノールの分子吸光係数 $\epsilon = 1$ 2000(ただし、化合物13、15及び16の化合物においては分子吸光係数 $\epsilon = 18000$ を使用)とからPAF-AH活性値(nmol/min/試料1ml)を上記の式により、算出した。その結果を表1に示す。式中、 $\Delta E_B$ は試料の代わりに精製水を加えて測定した値である。

表1

基質			PAF-AH 活性(*)	基質			PAF-AH 活性(*)
化合物 No.	R <sub>1</sub> 炭素数	A 炭素数		化合物 No.	R <sub>1</sub> 炭素数	A 炭素数	
1	8	3	83	13	14	3	62
2	10	3	98	15	14	3	67
3	12	3	133	16	14	3	78
4	14	3	111	17	14	3	44
5	18	3	55	20	14	3	265
6	16+18	3	48	25	16	3	77
7	16+18	3	62	26	16	2	241
8	14	2	457	27	16+18	2	214
9	14	4	123	28	18	2	201
10	14	5	50	29	8	2	335
11	14	6	37	30	10	2	362
12	14	7	17	31	12	2	392

\* (nmol/min/ml試料)

表1の結果から、一般式(I)のA=2~7の化合物がPAF-AHの基質となることがわかる。Aが小さいほどPAF-AHの活性は高い傾向にあり、一般式のA=2の場合が、最もPAF-AHの基質として優れていることを示している。

また、一般式 (I) のアシル基 ( $R_1$ ) の炭素数が 8 ~ 18 の場合も基質となり得ることが示された。 $R_1$  は、炭素数が 10 ~ 16 の場合、比較的活動性が高い傾向にあり、炭素数 12 ~ 14 がより活動性が高い傾向にある。さらに、 $R_1$  がアルケニル基 (化合物 7) の場合も基質となり得ることが示された。

発色剤としてハロゲン置換ニトロフェニル化合物を遊離する化合物 (化合物 13、15 及び 16) も、基質として有用であることが示された。

表 1 の結果を考慮すると、一般式 (I) の  $A=2$ 、 $R_1$  が 12 から 14 の化合物が PAF-AH の基質として適していると考えられる。特に、一般式 (I) の  $A$  が 2 であり、 $R_1$  が 14 である化合物 8 (1-ミリストイル-2-(4-ニトロフェニルサクシニル)-sn-グリセロールホスホコリン) が基質として最適であることがわかった。この化合物 8 は、一般的に PAF-AH の基質として使用されている化合物 4 (1-ミリストイル-2-(4-ニトロフェニルグルタリル)-sn-グリセロールホスホコリン (一般式 (I) の  $A=3$ 、 $R_1=14$ ) よりも、4 倍以上も高い感度の PAF-AH の基質であることを示している。

(実施例 3 : PAF-AH 活性の測定 ; 阻害剤の効果)

以下の阻害剤溶液と基質溶液とをそれぞれ、調製した。基質としては、化合物 8 (1-ミリストイル-2-(4-ニトロフェニルサクシニル)-sn-グリセロールホスホコリン) を用いた。

阻害剤溶液 :

表 2 に記載の阻害剤を、150mM NaCl を含む 50mM HEPES 緩衝液 (pH7.4) に、表 2 に記載の濃度で溶解した。

基質溶液 :

4 mM の化合物 8、40% エタノール及び 90 mM NaCl を含む 30 mM HEPES 緩衝液 (pH7.4)。

ヒトプール血清又はPAF-AH精製品10 $\mu$ lと阻害剤溶液900 $\mu$ l  
 とを混合し、37℃の恒温槽に5分放置した後、基質溶液100 $\mu$ lを添加  
 して、反応を開始した。基質溶液添加後、2分目から5分目にかけての単位  
 時間（1分間）当たりの吸光度の変化量（ $\Delta E$ ）とパラニトロフェノールの  
 分子吸光係数 $\epsilon = 12000$ とからPAF-AH活性値（nmol/min  
 /ml 試料）を算出した。その結果を表2に示す。

表2

添加物	濃度	ヒトプール血清		PAF-AH精製品	
		活性値	相対活性	活性値	相対活性
なし		389	100	256	100
ラウリル硫酸ナトリウム(SDS)	1mM	267	69	208	81
デカンスルホン酸ナトリウム	2.5mM	289	74	244	95
Triton X-100	0.05%	342	88	247	96
Tween-20	0.05%	294	76	239	93
CHAPS	5mM	347	89	264	103
コール酸ナトリウム	5mM	347	89	250	98
ラウリル硫酸ナトリウム(SDS) +TritonX-100	1mM 0.05%	225	58	200	78
ラウリル硫酸ナトリウム(SDS) +CHAPS	1mM 5mM	269	69	247	96

表2から明らかなように、各種阻害剤存在下において、ヒトプール血清と  
 PAF-AH精製品とでは、活性の挙動に大きな差異が観察された。すなわ  
 ち、PAF-AH精製品が、ほぼ、90%以上の活性を保持している（阻害剤  
 による活性の低下が小さい）のに対し、ヒトプール血清では90%以上の活  
 性が保持されているものがない。これは、PAF-AH精製品が精製された  
 結果、非特異的加水分解反応を生じる物質の含有量が少ないため、阻害剤に  
 より相対活性が低下しにくいと考えられるのに対して、ヒトプール血清には

非特異的加水分解反応を生じる物質が多く含まれており、阻害剤によってこの非特異的加水分解活性が抑制された結果、相対活性が低下したことを示唆する。すなわち、表2に記載の化合物（阻害剤）は、PAF-AHを阻害することは少ないが、PAF-AH以外のエステル分解活性関連物質を阻害すること、すなわち、PAF-AH以外のエステル分解活性関連物質の阻害剤であることが示された。

（実施例4：PAF-AH活性の測定：従来法との相関）

以下の試薬を準備した。

試薬1（A）（緩衝液）：

150 mM NaClを含む50 mM HEPES緩衝液（pH 7.4）

試薬2（A）（基質溶液）：

1.6 mMの化合物8、16%エタノール及び150 mM NaClを含む

50 mM HEPES緩衝液（pH 7.4）；

試薬1（B）（阻害剤溶液）：

150 mM NaCl、10 mM EDTA、1 mM ラウリル硫酸ナトリウム、5 mM CHAPSを含む50 mM HEPES緩衝液（pH 7.4）；

及び

試薬2（B）（基質と阻害剤とを含む溶液）：

150 mM NaCl、10 mM EDTA、1 mM ラウリル硫酸ナトリウム（SDS）、5 mM CHAPS、16%エタノール及び1.6 mMの化合物8を含む50 mM HEPES緩衝液（pH 7.4）。

血清試料：5種類の試料S1、S2、S3、S4およびS5。

PAF-AH活性の測定には、H-7170型自動分析装置（日立製作所）を使用した。測定時のパラメーターは、以下の通りである。

表3

入力項目	入力
RATE-A	25-34 POINT
S VOLUME	5 $\mu$ l
R1 VOLUME	240 $\mu$ l
R2 VOLUME	80 $\mu$ l
Wavelength	505-405nm
K-FACTOR	5417

5 上記パラメーターに従って、血清試料（S 1～S 5）5  $\mu$  l と試薬 1（A）（緩衝液）又は 1（B）（阻害剤溶液）240  $\mu$  l とを分注して混合し、37℃、5分間放置した。これに、以下のように基質、または基質と阻害剤溶液とを添加し、阻害剤なしのグループと阻害剤ありのグループを作成した：

10 阻害剤なしのグループ：血清試料と試薬 1（A）（緩衝液）とを混合した被験液に試薬 2（A）（基質溶液）を 80  $\mu$  l 添加したもの；

阻害剤ありのグループ：血清試料と試薬 1（B）（阻害剤溶液）とを混合した被験液に試薬 2（B）（基質と阻害剤とを含む溶液）を 80  $\mu$  l 添加したものの。

15 それぞれのグループでは、血清試料中の PAF-AH と基質（化合物 8）との反応によって化合物 8 が加水分解され、生成する 4-ニトロフェノールに由来する吸光度の上昇が認められた。この吸光度の変化（タイムコース）を図 1 および図 2 に示す。図 1 は、阻害剤が存在しない場合を、図 2 は、阻害剤が存在する場合を示す。

20 図 1 及び図 2 の比較から明らかなように、阻害剤が存在しない場合（図 1）より、阻害剤（SDS + CHAPS + EDTA）が存在する場合（図 2）の方が吸光度の上昇が抑制されている。これは、阻害剤（SDS + CHAPS + EDTA）により PAF-AH 以外のエステル分解活性関連物質の活性が阻害され、基質（化合物 8）の非特異的加水分解が抑制されることを示唆している。

次に、本発明のヒト血清 PAF-AH 活性測定方法と、従来法である放射性標識した PAF を基質に用いるヒト血清 PAF-AH 活性測定方法とを比較し、本発明の方法が有用であることを確認した。

本発明の方法による PAF-AH 活性は、基質（試薬 2 (A) 又は試薬 2 (B)）の添加後 2 分目から 5 分目にかけての単位時間（1 分間）当たりの吸光度の変化量（ $\Delta E$ ）とパラニトロフェノールの分子吸光係数  $\epsilon = 12000$  を用いて計算し、各血清試料の PAF-AH 活性値を算出した。

従来法である、放射性標識した PAF を基質に用いるヒト血清 PAF-AH 活性の測定は、以下に述べる方法で行った。

1- $O$ -オクタデシル [オクタデシル-9,10- $^3H(N)$ ] 2- $O$ -アセチル-sn-グリセロホスホコリン (NEN 社, NET-1009) 5 pmol (18.5 kBq)、1- $O$ -オクタデシル-2- $O$ -アセチル-sn-グリセロホスホコリン (BACHEM FEINCHEMIKALIEN AG 社, 0-1355) 34 pmol、及びヒト血清適量（50～100 倍希釈、6.5～37.5  $\mu$ l、各サンプル 3 濃度段階）を 100 mM トリス-塩酸緩衝液（pH 7.4）、5 mM EDTA に懸濁し、全量を 0.1 ml にして 37℃ で 10 分間インキュベートした。反応終了後、Bligh & Dyer 法により脂質を抽出した。即ち、反応液にクロロホルム 0.125 ml とメタノール 0.25 ml を加えて 2 分間振とうし、次に、クロロホルム 0.125 ml を加えて 30 秒間振とうし、最後に、水を 0.1 ml 加えて 30 秒間振とうした。その後、遠心分離（400 g、3 分間）し、下層（有機層）0.04 ml を TLC（メルク社製、5554-1 M）にスポットし、展開溶媒（クロロホルム：メタノール：水 = 65：35：6）で展開した。放射能は、フジフィルム社製バイオイメージングアナライザー MacBAS 5000 を用いて測定した。酵素活性は、試料であるヒト血清の用量（ $\mu$ l）と反応時間（10 分）とで測定された放射能により換算される生成リゾ PAF 量（nmol）を用いて、単位



時間、単位液量当りに生成するリゾPAFのモル数を求め、 $\text{nmol}/\text{min}/\text{ml}$ で表した。

化合物8を用いた測定の結果(Y)と放射性標識PAFを用いた測定結果(X)との相関を、阻害剤なしの場合を図3に、阻害剤ありの場合を図4にそれぞれ示した。阻害剤なしの場合(図3)の回帰直線は、 $Y = 206X + 307$ 、相関係数は、 $R = 0.970$ であった。阻害剤ありの場合(図4)の回帰直線は、 $Y = 179X + 93.6$ 、相関係数は、 $R = 0.997$ であった。このように、いずれの場合においても、強い相関関係がみられ、かつ、阻害剤が存在する場合は、極めて強い相関関係が見られ、化合物8及び本発明の測定方法の有用性が確認された。

#### (実施例5：PAF-AHの測定)

化合物8を用い、正常域プール血清(商品名：ネスコールーX、製造元財団法人化学及び血清療法研究所、発売元株式会社アズウェル)中のPAF-AH活性を測定した。実施例4と同様、阻害剤を含む系と含まない系とを用い、10回繰り返し実験を行った結果を表4に示す。なお、阻害剤として、SDS、CHAPSおよびEDTAを用いた。

表4

実験 No	活性( $\text{nmol}/\text{min}/\text{ml}$ 試料)	
	阻害剤なし	阻害剤あり
1	640	348
2	671	329
3	598	348
4	603	346
5	656	344
6	603	336
7	593	336
8	585	332
9	613	344
10	681	329
平均	624	339
標準偏差	34.8	7.7
C. V. (%)	5.6	2.3

表4に示すように、阻害剤なしで化合物8を用いた場合、PAF-AH以外のエステル分解活性関連物質も測り込むので測定値も大きく、標準偏差も大きい。阻害剤が存在する場合、標準偏差が小さく、PAF-AH活性を精度よく測定できることが示された。このことから、化合物8が基質として優れていること、およびこの化合物8を基質として用い、かつ阻害剤を用いることにより、精度良く血清中のPAF-AH活性が測定できることが確認された。

#### (実施例6)

化合物5（1-オレオイル-2-（4-ニトロフェニルグルタリル）-sn-グリセロールホスホコリン）を用いて、表5に記載の阻害剤を用いて、実施例2と同様にしてPAF-AH活性を測定した。結果を表5に示す。

表5

添加物	濃度	ヒトプール血清		PAF-AH精製品	
		活性値*1)	相対活性	活性値*1)	相対活性
なし		214	100	55	100
SDS	1mM	78	36	28	51
デカンスルホン酸Na	2.5mM	83	39	58	106
Triton X-100	0.05%	150	70	50	91
Tween-20	0.05%	119	56	39	71
CHAPS	5mM	168	79	66	120
コール酸 Na	5mM	164	77	75	136
SDS+	1mM				
Triton X-100	0.05%	61	29	41	75
SDS+	1mM				
CHAPS	5mM	97	45	78	142

\*1) nmol/min/ml 試料

デカンスルホン酸ナトリウム、CHAPS、コール酸ナトリウム、およびSDS+CHAPSは、精製されたPAF-AHを活性化する方向に働くが、ヒトプール血清を用いた場合には、みかけのPAF-AH活性を大幅に低下

させることが示された。このことは、これらの阻害剤は PAF-AH それ自体を阻害しないが、非特異的加水分解反応を生じる物質を阻害することを示している。その他の阻害剤についても、ヒトプール血清中の PAF-AH 活性の低下の方が、PAF-AH 精製品の活性の低下より大きく、非特異的加水分解反応を生じる物質が阻害されることを示している。

従って、阻害剤の存在下で、化合物 5 を基質として用いて PAF-AH 活性を測定すると、良好な結果が得られることを示している。

#### (実施例 7)

化合物 12 (1-ミリストイル-2-(4-ニトロフェニルアゼロイル)-sn-グリセロホスホコリン) を用いて、表 6 に記載の阻害剤を用いて、実施例 2 と同様にして、PAF-AH 活性を測定した。結果を表 6 に示す。

表 6

添加物	濃度	ヒトプール血清		PAF-AH 精製品	
		活性値*1)	相対活性	活性値*1)	相対活性
なし		133	100	16	100
SDS	1mM	41	31	22	138
デカンスルホン酸 Na	2.5mM	31	23	11	69
Triton X-100	0.05%	125	94	16	100
Tween-20	0.05%	106	80	14	88
CHAPS	5mM	119	89	17	106
コール酸 Na	5mM	86	65	22	138
SDS+	1mM				
Triton X-100	0.05%	42	32	22	138
SDS+	1mM				
CHAPS	5mM	53	40	28	175

\*1) nmol/min/ml 試料

SDS、Triton X-100、CHAPS、コール酸ナトリウム、SDS+Triton X-100、および SDS+CHAPS は、精製された PAF-AH を活性化する、または阻害しない方向に働くが、ヒトプール血

清を用いた場合には、みかけの PAF-AH 活性を大幅に低下させることが示された。このことは、これらの阻害剤は PAF-AH それ自体を阻害しないが、非特異的加水分解反応を生じる物質を阻害することを示している。その他の阻害剤についても、ヒトプール血清中の PAF-AH 活性の低下の方が、PAF-AH 精製品の活性の低下より大きく、非特異的加水分解反応を生じる物質が阻害されることを示している。

従って、阻害剤の存在下で、化合物 12 を基質として用いて PAF-AH を測定すると、良好な結果が得られることを示している。

(実施例 8)

化合物 23 (1-ミリストイル-2-[(4-ニトロフェニル)ジメチルサクシニル]-sn-グリセロールホスホコリン) を用いて、表 7 に記載の阻害剤を用いて、実施例 2 と同様にして、PAF-AH 活性を測定した。結果を表 7 に示す。

表 7

添加物	濃度	ヒトプール血清		PAF-AH 精製品	
		活性値*1)	相対活性	活性値*1)	相対活性
なし		193	100	19	100
SDS	1mM	83	43	25	132
デカンスルホン酸 Na	2.5mM	69	36	27	142
Triton X-100	0.05%	125	65	19	100
Tween-20	0.05%	111	58	22	116
CHAPS	5mM	144	75	22	116
コール酸 Na	5mM	130	68	25	132
SDS+	1mM				
Triton X-100	0.05%	44	23	19	100
SDS+	1mM				
CHAPS	5mM	70	36	23	121

\*1) nmol/min/ml 試料

表 7 で用いたすべての阻害剤は、精製された PAF-AH を活性化する、または阻害しない方向に働くが、ヒトプール血清を用いた場合には、みかけの PAF-AH 活性を大幅に低下させることが示された。このことは、これ

らの阻害剤はPAF-AHそれ自体を阻害しないが、非特異的加水分解反応を生じる物質を阻害することを示している。

従って、阻害剤の存在下で、化合物23を基質として用いてPAF-AHを測定すると、良好な結果が得られることを示している。

# 5 (実施例9)

化合物28 (1-オレオイル-2-(4-ニトロフェニルサクシニル)-sn-グリセロールホスホコリン) を用いて、表8に記載の阻害剤を用いて、実施例2と同様にして、PAF-AH活性を測定した。結果を表8に示す。

結果を表8に示す。

10 表8

添加物	濃度	ヒトプール血清		PAF-AH精製品	
		活性値*1)	相対活性	活性値*1)	相対活性
なし		277	100	108	100
デカンスルホン酸Na	2.5mM	142	51	100	93
Triton X-100	0.05%	245	88	200	185
Tween-20	0.05%	183	66	120	111
CHAPS	5mM	239	86	173	160
コール酸 Na	5mM	225	81	141	131
SDS+	1mM				
Triton X-100	0.05%	139	50	125	116
SDS+	1mM				
CHAPS	5mM	208	75	188	174

\*1)nmol/min/ml試料

20 TritonX-100、Tween-20、CHAPS、コール酸ナトリウム、SDS+TritonX-100、およびSDS+CHAPSは、精製されたPAF-AHを活性化する、または阻害しない方向に働くが、ヒトプール血清を用いた場合には、みかけのPAF-AH活性が大幅に低下することが示された。このことは、これらの阻害剤はPAF-AHそれ自体を  
25 阻害しないが、非特異的加水分解反応を生じる物質を阻害することを示している。デカンスルホン酸ナトリウムについても、ヒトプール血清中のPAF

—AH活性の低下の方が、PAF—AH精製品の活性の低下より大きく、非特異的加水分解反応を生じる物質が阻害されることを示している。

従って、阻害剤の存在下で、化合物28を基質として用いてPAF—AHを測定すると、良好な結果が得られることを示している。

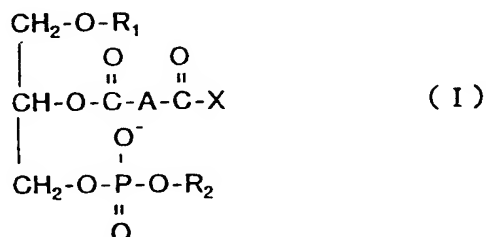
- 5      以上のように、一般式(I)で表される化合物の $R_1$ およびAの異なる種類の化合物を基質として用い、阻害剤存在下でPAF—AH活性が正確に行えることが明らかになった。

#### 産業上の利用可能性

- 10      本発明のPAF—AH活性測定法によれば、放射性標識基質を用いることなく、試料中のPAF—AH活性を直接測定することが可能となるので、日常の検査に安全、迅速、簡単な測定方法として充分利用できる。
- また、本発明のPAF—AH活性測定法は、従来の方法より測定時間が短縮されること、種々エステラーゼやエステラーゼ様物質の影響を受けないこと、
- 15      発色性化合物をモニターすることにより直接的にPAF—AH活性を測定することができる等の利点を有するため、従来の、発色系へ誘導する酵素や試薬を使用する方法に比べて、より正確、かつ迅速な測定が可能であることから、疾患の検定、予後の経過を短時間で診断できるようになる。従って、本発明は、極めて有用性が高い、PAF—AH活性測定法を提供する。

## 請求の範囲

1. 血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ活性の測定方法であって、該方法は、一般式 (I) :



(式中、 $R_1$ はアシル基、アルキル基又はアルケニル基を表し、Aは酸素原子が介在してもよい飽和または不飽和の、置換又は非置換の炭素数2～7の炭化水素基を表し、Xは遊離したときに発色性化合物又は蛍光発色性化合物となる基を表し、 $R_2$ はモノメチルアミノエチル基、ジメチルアミノエチル基又はトリメチルアミノエチル基を表す。) で表される基質と、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ含有試料とを、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼを阻害しないが、他のエステル分解活性関連物質を阻害する阻害剤の存在下、反応させ、それによって遊離する発色性化合物又は蛍光発色性化合物の量を測定することを含む、測定方法。

2. 前記発色性化合物が芳香族ヒドロキシ化合物又は芳香族チオール化合物である、請求項1に記載の測定方法。

3. 前記阻害剤が、アニオン性界面活性剤、非イオン界面活性剤、胆汁酸塩、胆汁酸塩誘導体及びキレート剤からなる群から選択される少なくとも1種の阻害剤である、請求項1又は2に記載の測定方法。

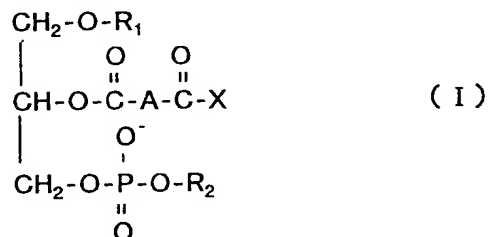
4. 前記アニオン性界面活性剤が、アルキル硫酸のアルカリ金属塩又はアルキルスルホン酸のアルカリ金属塩である、請求項3に記載の測定方法。

5. 前記非イオン界面活性剤が、ポリオキシエチレンアルキルアリルエーテ

ル又はポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルである、請求項3に記載の測定方法。

6. 前記胆汁酸塩及び胆汁酸塩誘導体が、コール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム、ケノデオキシコール酸ナトリウム、デヒドロコール酸ナトリウム、タウロコール酸ナトリウム、タウロリトコール酸ナトリウム、タウロデオキシコール酸ナトリウム、タウロケノデオキシコール酸ナトリウム、タウロウルソデオキシコール酸ナトリウム、タウロデヒドロコール酸ナトリウム、CHAPS、CHAPSO、BIGCHAP、又はデオキシ-BIGCHAPである請求項3に記載の測定方法。

7. 血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ活性測定用試薬であって、該試薬は、一般式 (I) :



(式中、 $R_1$ はアシル基、アルキル基又はアルケニル基を表し、Aは酸素原子が介在してもよい飽和または不飽和の、置換又は非置換の炭素数2～7の炭化水素基を表し、Xは遊離したときに発色性化合物又は蛍光発色性化合物となる基を表し、 $R_2$ はモノメチルアミノエチル基、ジメチルアミノエチル基又はトリメチルアミノエチル基を表す。) で表される基質と、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼを阻害しないが、他のエステル分解活性関連物質を阻害する阻害剤とを含有する、試薬。

8. 前記発色性化合物が芳香族ヒドロキシ化合物又は芳香族チオール化合物である、請求項7に記載の試薬。

9. 前記阻害剤が、アニオン性界面活性剤、非イオン界面活性剤、胆汁酸塩、



胆汁酸塩誘導体及びキレート剤からなる群から選択される少なくとも1種の阻害剤である、請求項7又は8に記載の試薬。

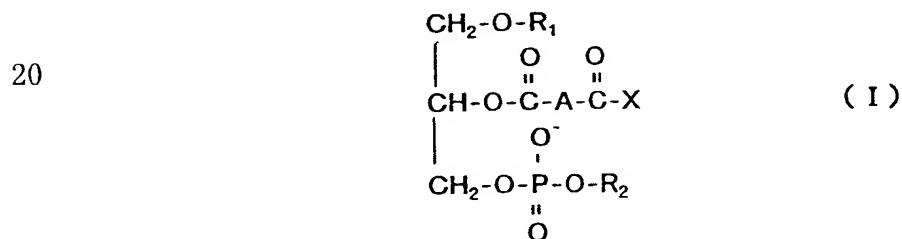
10. 前記アニオン性界面活性剤が、アルキル硫酸のアルカリ金属塩又はアルキルスルホン酸のアルカリ金属塩である、請求項9に記載の試薬。

5 11. 前記非イオン界面活性剤が、ポリオキシエチレンアルキルアリルエーテル又はポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルである、請求項9に記載の試薬。

12. 前記胆汁酸塩及び胆汁酸塩誘導体が、コール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム、ケノデオキシコール酸ナトリウム、デヒドロコール酸ナトリウム、タウロコール酸ナトリウム、タウロリトコール酸ナトリウム、  
10 タウロデオキシコール酸ナトリウム、タウロケノデオキシコール酸ナトリウム、タウロウルソデオキシコール酸ナトリウム、タウロデヒドロコール酸ナトリウム、CHAPS、CHAPSO、BIGCHAP、又はデオキシーBIGCHAPである請求項9に記載の試薬。

15 13. 請求項7から12いずれかの項に記載の試薬を含む、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ活性測定用キット。

14. 血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ活性測定用キットであって、該キットは、一般式(I)：



(式中、R<sub>1</sub>はアシル基、アルキル基又はアルケニル基を表し、Aは酸素原子が介在してもよい飽和または不飽和の、置換又は非置換の炭素数2～7の炭化水素基を表し、Xは遊離したときに発色性化合物又は蛍光発色性化合物

25

となる基を表し、 $R_2$ はモノメチルアミノエチル基、ジメチルアミノエチル基又はトリメチルアミノエチル基を表す。) で表される基質を含む容器と、

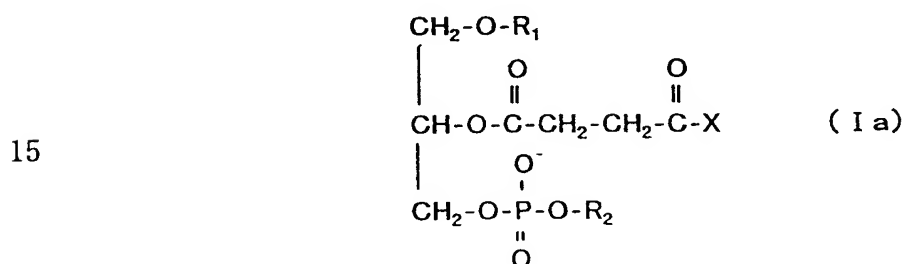
血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼを阻害しないが、他のエステル分解活性関連物質を阻害する阻害剤を含有する溶液を含む容器とを有する、キット。

15 15. 前記発色性化合物が芳香族ヒドロキシ化合物又は芳香族チオール化合物である、請求項14に記載のキット。

16. 前記基質が、溶液あるいは溶媒中に溶解されている、請求項14又は15に記載のキット。

10 17. さらに、前記基質を溶解する溶液あるいは溶媒を含有する容器を有する、請求項15又は16に記載のキット。

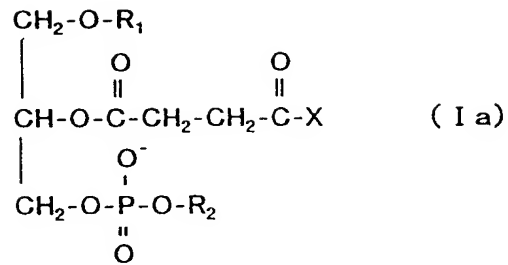
18. 一般式(I a) で表される化合物：



(式中、 $R_1$ は炭素数6から20のアシル基、アルキル基又はアルケニル基を表し、Xは遊離したときに発色性化合物又は蛍光発色性化合物となる基を表し、 $R_2$ はモノメチルアミノエチル基、ジメチルアミノエチル基又はトリメチルアミノエチル基を表す。)

19. 前記発色性化合物が芳香族ヒドロキシ化合物又は芳香族チオール化合物である、請求項18に記載の化合物。

20. 血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ活性の測定方法であって、該方法は、一般式(I a) で表される化合物：



5

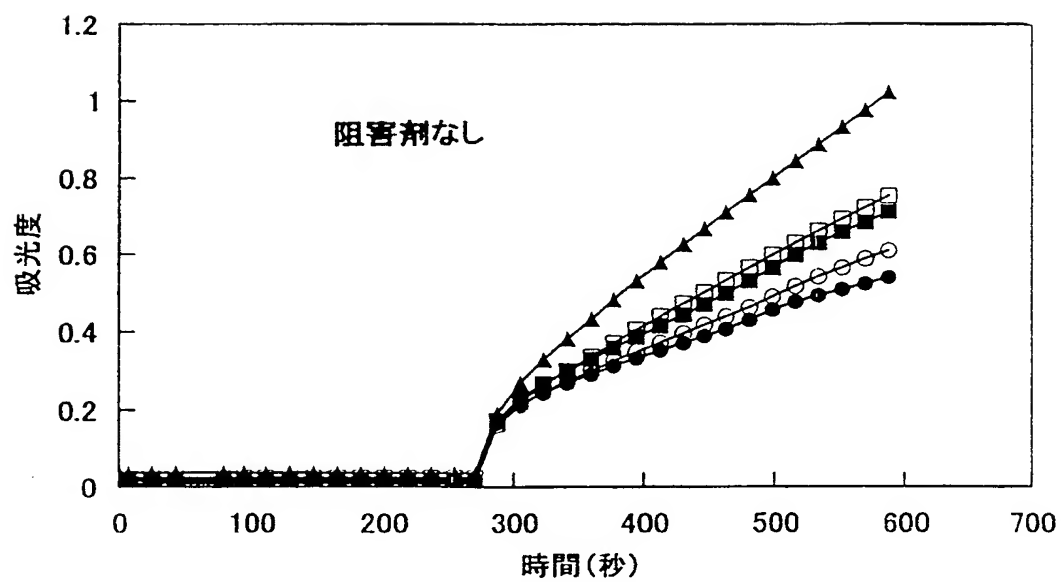
(式中、 $R_1$ は炭素数6から20のアシル基、アルキル基又はアルケニル基を表し、 $X$ は遊離したときに発色性化合物又は蛍光発色性化合物となる基を表し、 $R_2$ はモノメチルアミノエチル基、ジメチルアミノエチル基又はトリメチルアミノエチル基を表す。) で表される基質と、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ含有試料とを反応させ、それによって遊離する発色性化合物又は蛍光発色性化合物の量を測定することを含む、測定方法。

10

21. 前記発色性化合物が芳香族ヒドロキシ化合物又は芳香族チオール化合物である、請求項20に記載の測定方法。

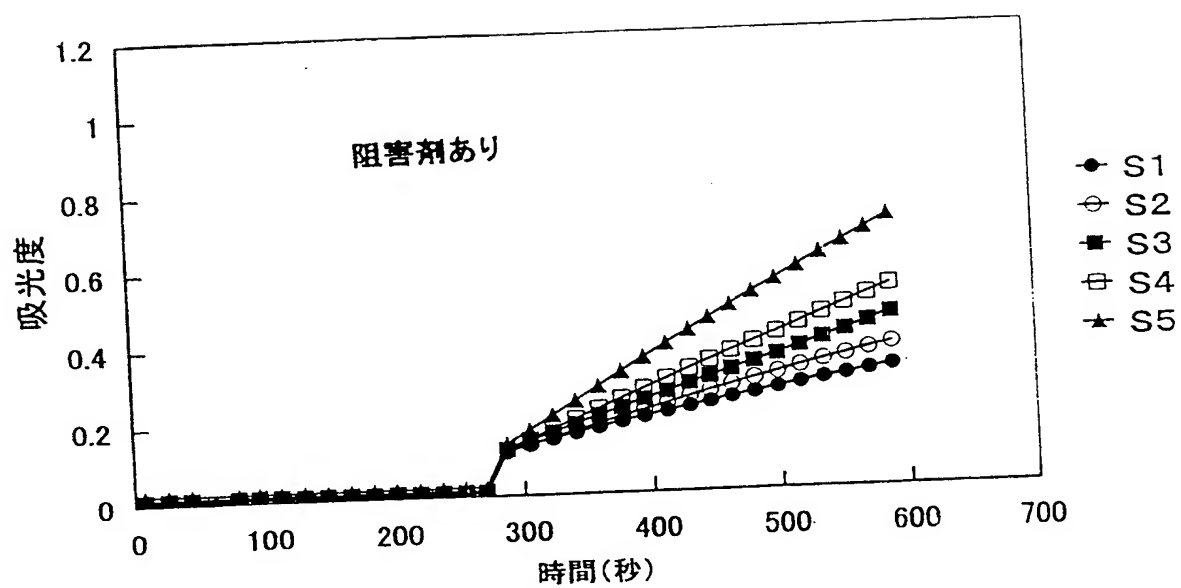
1 / 4

第1図



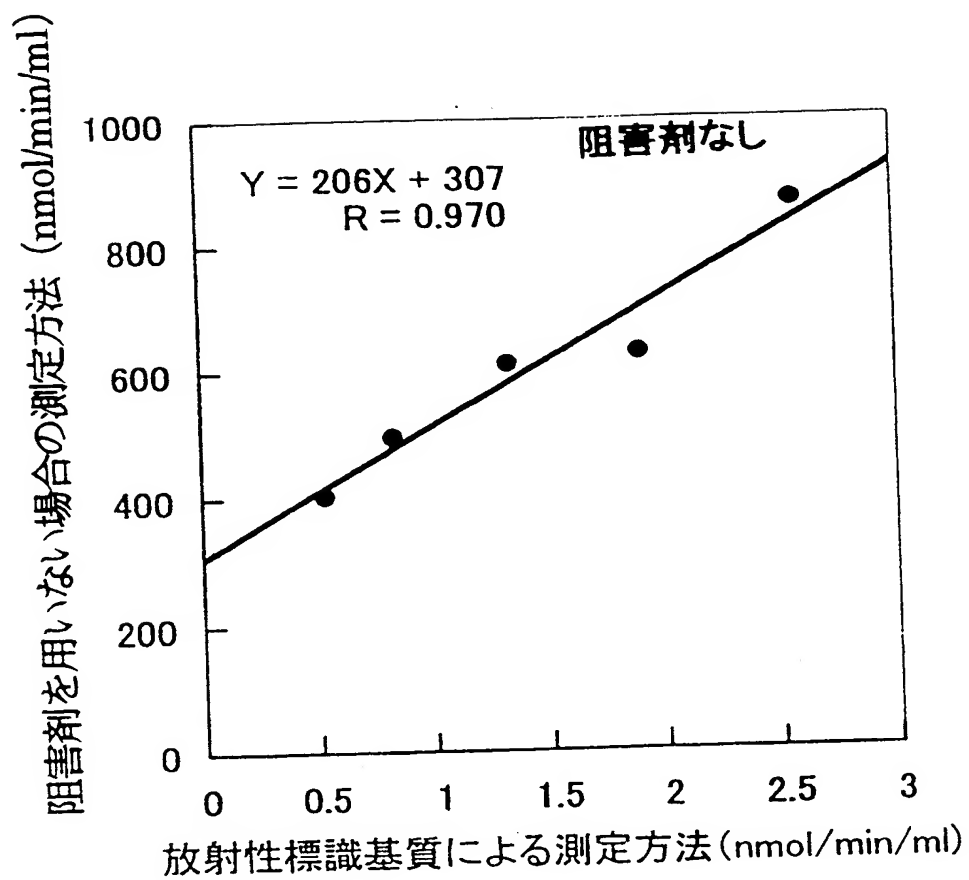
2 / 4

第2図

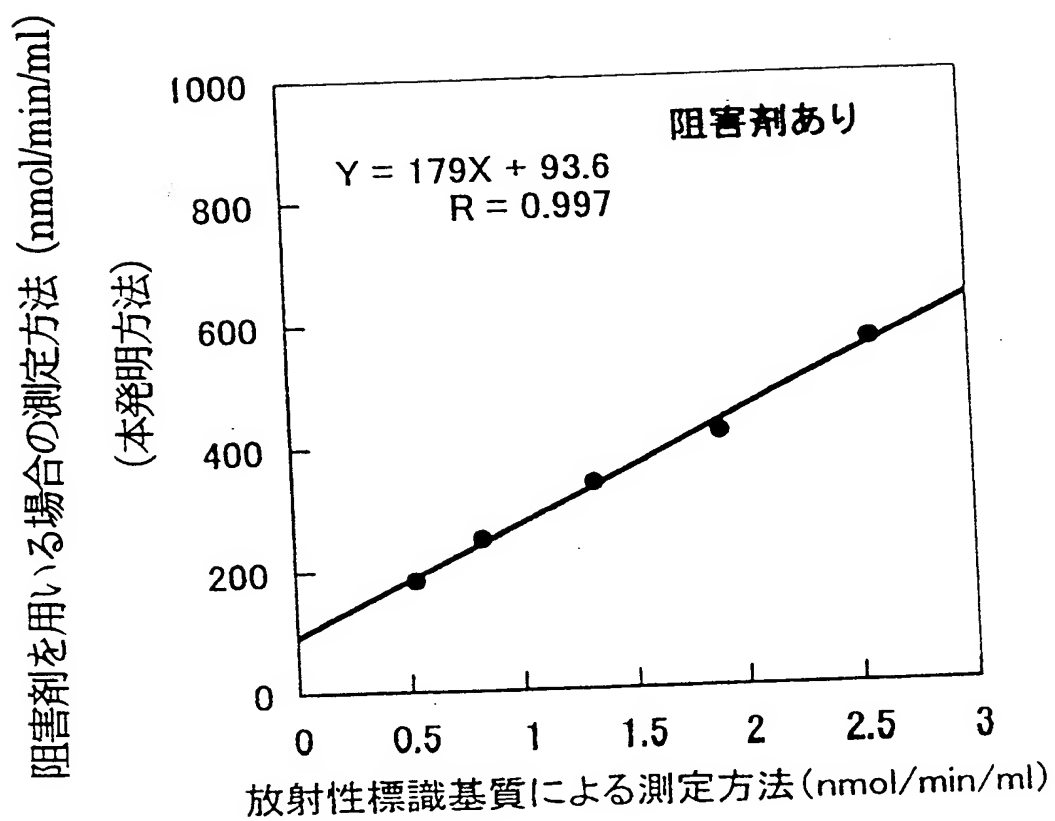


3 / 4

第3図



第4図



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06745

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl<sup>7</sup> C12Q1/34, G01N33/49

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>7</sup> C12Q1/34-46, G01N33/49

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
BIOSIS (DIALOG), CA (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP, 331167, A1 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH), 02 March, 1989 (02.03.89) & JP, 2-3662, A & DE, 3807123, A & US, 5091527, A & ES, 2034437, T3	1-21
Y	JP, 4-346797, A (Shinotesuto K.K.), 02 December, 1992 (02.12.92) (Family: none)	1-21
A	JP, 58-94400, A (DAINIPPON PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 04 June, 1983 (04.06.83) (Family: none)	1-21
A	JP, 56-15698, A (Dow Chemical Co.), 14 February, 1981 (14.02.81) & US, 4279994, A & DE, 3020072, A & GB, 2065881, A & FR, 2461007, A	1-21

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
"E" earlier document but published on or after the international filing date  
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
28 February, 2000 (28.02.00)

Date of mailing of the international search report  
14 March, 2000 (14.03.00)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int. C 1<sup>7</sup> C 12 Q 1/34, G 01 N 33/49

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
Int. C 1<sup>7</sup> C 12 Q 1/34~46, G 01 N 33/49

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
BIOSIS (DIALOG), CA (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	EP, 331167, A1 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 02. 3月. 1989 (02. 03. 89) & JP, 2-3662, A&DE, 3807123, A&US, 5091527, A&ES, 2034437, T3	1-21
Y	JP, 4-346797, A (株式会社シノテスト) 02. 12月. 1992 (02. 12. 92) (ファミリーなし)	1-21
A	JP, 58-94400, A (大日本製薬株式会社) 04. 6月. 1983 (04. 06. 83) (ファミリーなし)	1-21
A	JP, 56-15698, A (ザ・ダウ・ケミカル・コンパニー) 14. 2月. 1981 (14. 02. 81) & US, 4279994, A&DE, 3020072, A&GB, 2065881, A&FR, 2461007, A	1-21

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献  
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日  
28. 02. 00

国際調査報告の発送日

14.03.00

国際調査機関の名称及びあて先  
日本国特許庁 (ISA/J P)  
郵便番号 100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)  
鈴木 恵理子

4N

8114

電話番号 03-3581-1101 内線 3448